



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**1995**

**TESIS DOCTORAL:  
ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INTERLEUQUINA 6 (IL-6)  
SOBRE LA SÍNTESIS DE COLÁGENO, Y DE SUS  
MECANISMOS DE ACCIÓN, EN CULTIVOS DE LIPOCITOS.**

**DOCTORANDO: ERNESTO SANTIAGO LUNA.**

**DIRECTOR: DR. JOSÉ ANTONIO SOLÍS HERRUZO.**

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D. José Antonio Solís Herruzo, Catedrático de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Medicina,

Informa que el trabajo "ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INTERLEUQUINA 6 (IL-6) SOBRE LA SINTESIS DE COLAGENO, Y DE SUS MECANISMOS DE ACCION, EN CULTIVOS DE LIPOCITOS" ha sido realizado por D. - ERNESTO SANTIAGO LUNA bajo su dirección. La metodología aplicada ha sido la correcta para el logro de los objetivos planteados y los resultados han sido revisados y contrastados. En el curso de la realización del estudio el doctorando ha adquirido formación en la preparación de cultivos celulares, de la medición de síntesis, secreción, hidroxilación y degradación del colágeno y ha utilizado técnicas de Biología Molecular, incluyendo la determinación de los niveles celulares de RNA, la transfección de plásmidos en células y la valoración de la actividad cloranfenicol acetil transferasa. Por ello creemos que este trabajo garantiza el logro de uno de los fines buscados por el tercer ciclo de los estudios Universitarios, y reúne los requisitos exigidos para ser presentado como Tesis Doctoral.

EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

Fdo.: \_\_\_\_\_

(fecha y firma)

D.N.I.:

Fdo. José A. Solís Herruzo

(fecha y firma) 8/3/95

D.N.I.: 334.527

## INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

Prof. Dr. Carlos Perezagua Clamagirand, Director del Departamento de medicina de la Facultad de Medicina de la UCM

Informa: que una vez examinado el Trabajo presentado por D. ERNESTO SANTIAGO LUNA, titulado: "ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INTERLEUQUINA 6 (IL-6) SOBRE LA SINTESIS DE COLAGENO, Y DE SUS MECANISMOS DE ACCION, EN CULTIVOS DE LIPOCITOS", dirigido por el Prof. Dr. José Antonio Solís Herruzo, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

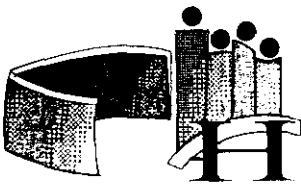
Fecha reunión  
Consejo Departamento

15-marzo-1995

El Director del Departamento

Fdo.: \_\_\_\_\_

(fecha y firma)



HOSPITAL UNIVERSITARIO  
12 DE OCTUBRE  
MADRID



**D. José Antonio Solís Herruzo**, Catedrático de Medicina en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Medicina,

Informa que el trabajo **"Estudio del efecto de la Interleucina 6 (IL-6) sobre la síntesis de colágeno y de sus mecanismos de acción en cultivos de lipocitos"** ha sido realizado por **D. Ernesto Santiago Luna** bajo su dirección. La metodología aplicada ha sido la correcta para el logro de los objetivos buscados y los resultados obtenidos han sido revisados y contrastados. En el curso de la realización del estudio, el doctorando ha adquirido formación en el campo de preparación de cultivos celulares, de la medición de síntesis, secreción, hidroxilación y degradación del colágeno y ha utilizado técnicas de biología molecular, incluyendo la determinación de los niveles celulares de RNA, la transfección de células y valoración de la actividad de la cloramfenicol acetil transferasa. Por ello este trabajo garantiza el logro de uno de los fines buscados por el tercer ciclo de los estudios Universitarios y reúne los requisitos exigidos para ser presentado como tesis doctoral.

Madrid, 16 de Marzo de 1995.

Fdo. José Antonio Solís Herruzo.

Director de la Tesis.

La presente tesis fue realizada con recursos del Fondo de Investigaciones Sanitarias (España), así como una beca para estancia doctoral de la Universidad de Guadalajara (México).

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO:

Dedico esta tesis a mis padres, Don Honorato y Doña Lucrecia; con sus esfuerzos han hecho que sus hijos lleguemos cada vez mas lejos.

Al Dr. José Antonio Solís Herruzo; su ejemplo, dirección y ayuda me permitieron llevar a término esta tesis.

Al Dr. Héctor R. Moreno Villa; por su amistad y ayuda en tiempos buenos y malos.

*Inmaculada Hernández, Ma. Paz de la Torre, José Antonio Sánchez, Inmaculada García, y muchos más compañeros del Centro de Investigación, por su amistad y ayuda.*

Para mis maestros y compañeros, por el ejemplo y ayuda de unos y otros.

## ÍNDICE

<u>Capítulo.</u>	<u>Página.</u>
I. INTRODUCCIÓN .....	8
II. ANTECEDENTES .....	13
1.- Anatomía e histología del hígado .....	13
2.- Composición celular del hígado .....	14
3.- Componentes de la matriz extracelular del hígado .....	18
A) Laminina, 20.	
B) Fibronectina, 21.	
C) Proteoglicanos, 21.	
D) Colágenos, 22.	
4.- Fibrogénesis y matriz extracelular hepática .....	26
5.- Regulación de la matriz extracelular .....	29
6.- Citoquinas inflamatorias y fibrosis hepática .....	31
7.- Generalidades de las vías intracelulares de la transducción de señal .....	33
A) Proteínas G, 33.	
B) Vía del ácido araquidónico, 35.	
C) Vía de la fosfolipasa C, 36.	
D) Calcio, 38.	
E) Diacilglicerol, 40.	

F) Vía de la adenilato ciclasa, 42.	
8.- Biosíntesis de colágeno .....	44
A) Generalidades, 45.	
B) Procesos intracelulares, 53.	
C) Secreción, 55.	
D) Proceso extracelular, 55.	
9.- Reabsorción del colágeno .....	57
A) Colagenasas, 58.	
10.- Interleuquina 6 (IL-6) .....	61
A) Estructura del gen de la IL-6, 62.	
B) Estructura de la proteína IL-6, 62.	
C) Regulación de la biosíntesis de la IL-6, 64.	
D) Mecanismos de acción de la IL-6, 65.	
 III. OBJETIVOS .....	 69
 IV. MATERIAL Y MÉTODOS .....	 70
1.- Material .....	70
2.- Métodos .....	72
A) Cultivo celular, proliferación y citotoxicidad, 72.	
B) Unión de la IL-6 a su receptor, 73.	
C) Colágeno, 74.	
D) Cuantificación de RNAm procolágeno $\alpha_1(I)$ , 76.	

E) Cloranfenicol Acetil Transferasa, 77.

V. RESULTADOS .....	82
1.- Unión de la IL-6 a sus receptores de membrana .....	82
2.- Efecto proliferativos de la IL-6 sobre lipocitos hepáticos en cultivo .....	83
3.- Efecto citotóxico de la IL-6 sobre lipocitos hepáticos en cultivo.....	84
4.- Efecto de la IL-6 sobre el promotor del procolágeno $\alpha_1$ (I) .....	85
5.- Efecto de la IL-6 sobre el RNAm de procolágeno $\alpha_1$ (I) .....	87
A) Respuesta a diferentes concentraciones, 87.	
B) Respuesta a diferentes tiempos de incubación, 88.	
C) Inhibición de síntesis de proteínas, 89.	
D) Inhibición de las vías intracelulares de transducción de señal, 90.	
6.- Efecto de la IL-6 sobre la producción de colágeno en lipocitos hepáticos en cultivo .....	97
A) Producción de colágeno total, 97.	
B) Tasa de secreción de colágeno, 98.	
C) Producción de colágeno celular y extracelular, 101.	
D) Actividad de colagenasa, 102.	
VI. DISCUSIÓN .....	104



VII. CONCLUSIONES .....	110
VIII. RESUMEN .....	112
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	119

## I. INTRODUCCIÓN.

Algunas enfermedades del hígado (tanto agudas como crónicas) pueden ocasionar durante su evolución la destrucción del parénquima con sustitución de tejido normal por otro no funcional, lo que provoca graves consecuencias en el organismo.

Aunque no existe una equivalencia directa entre los términos de fibrosis y cirrosis hepática, ambos tienden a solaparse. El primero se refiere a un proceso en el cual existe un aumento de la producción y depósito del colágeno, así como de otras proteínas de la matriz extracelular, mientras que el segundo se refiere específicamente a un proceso difuso en el que se presenta fibrosis con nódulos de regeneración.

De acuerdo a estas definiciones, hay casos de fibrosis hepática que no pueden ser considerados como cirrosis, como son determinados estadios de la *hepatopatía alcohólica*, y también casos de *nódulos hepáticos sin fibrosis*, por ejemplo la transformación nodular parcial del hígado.

A pesar de las consideraciones anteriores, la cirrosis hepática es representativa de las entidades en que la fibrosis hepática es dominante. Dentro de las múltiples etiologías que la originan, se mencionan las siguientes:

1. Hepatitis viral.
2. Alcohol.
3. Alteraciones metabólicas.
  - a. Hemocromatosis.

- b. Enfermedad de Wilson.
  - c. Deficiencia de  $\alpha_1$ -antitripsina.
  - d. Diabetes mellitus.
  - e. Glicogenosis tipo IV.
  - f. Galactosemia.
  - g. Tirosinosis congénita.
4. Colestasis prolongada.
- a. Intrahepática.
  - b. Extrahepática.
5. Obstrucción del flujo venoso hepático.
- a. Enfermedad veno-oclusiva.
  - b. Síndrome de Budd-Chiari.
  - c. Pericarditis constrictiva.
6. Alteraciones de la inmunidad.
- a. Hepatitis autoinmune.
  - b. Cirrosis biliar.
  - c. Colangitis autoinmune.
  - d. Esclerosis primaria.
7. Toxinas y agentes terapéuticos.
- a. Metrotexate.
  - b. Amidarone.
8. Cortocircuitos intestinales.
9. Cirrosis India de la infancia.

Al hacer una revisión de la repercusión que tienen algunos tipos de cirrosis, encontramos que la etiología alcohólica se encuentra en aumento. Como ejemplo, en el Royal Free Hospital (Inglaterra), en el período comprendido entre los años 1959 y 1965, la cirrosis alcohólica representó el 4.3% de los ingresos por cirrosis, mientras que en el período comprendido entre 1978 y 1983 representó el 25%.

En los EUA, el alcoholismo es la cuarta causa de muerte de los varones adultos; en España, donde se tiene un consumo de casi 15 litros de alcohol por persona/año, existen aproximadamente 250,000 personas con cirrosis hepática, siendo esta causa (el alcohol) el origen del 70% de los casos, con una mortalidad de 23 personas por 100,000 habitantes por año.<sup>115,159,167</sup>

En el caso de la cirrosis hepática de etiología viral, se estima que existen aproximadamente 300 millones de individuos portadores del virus de la hepatitis tipo B (HBV) y, aunque su curso clínico varía, su pronóstico es proporcional a la gravedad de la enfermedad. Existen estudios en donde hasta el 20% de los pacientes con hepatitis crónica por esta causa desarrollan cirrosis hepática activa en el plazo de 1 a 13 años.<sup>50</sup>

Además, con la identificación de nuevos virus se está aclarando la etiología precisa de las hepatitis virales antes denominadas como No A No B, algunas de las cuales evolucionan hacia un curso crónico. En efecto, durante los últimos años se ha identificado el denominado virus de la hepatitis tipo C (HCV), el cual evoluciona en más del 60% de los casos en forma crónica, y origina cirrosis en el 40% al 50% de las ocasiones.<sup>22,30,157</sup>

Existen otras entidades menos frecuentes que pueden desarrollar fibrosis hepática. Destaca entre ellas la hemocromatosis primaria, que es un trastorno del metabolismo del hierro, el cual está determinado genéticamente y se caracteriza por el depósitos de este metal en los tejidos. Por ello, aproximadamente el 30% de los pacientes que la padecen desarrollan insuficiencia cardíaca, el 25% cirrosis hepática y el 30% carcinoma hepatocelular, este último a pesar de que se logre eliminar el hierro depositado.

Otra enfermedad metabólica que causa fibrosis es la enfermedad de Wilson. Se trata de un trastorno familiar raro que se transmite en forma autosómica recesiva, y que se caracteriza por una absorción excesiva de cobre y escasa eliminación urinaria del mismo; ello determina el depósito de este metal en los tejidos (principalmente en el hígado) donde ocasiona necrosis, inflamación, fibrosis y cirrosis.

Finalmente, la deficiencia de  $\alpha_1$ -antitripsina consiste en una alteración metabólica que aparece en 1 de cada 1,700 adultos, y se manifiesta por su asociación con hepatopatía crónica, cirrosis y neumopatía.<sup>47</sup>

La respuesta normal del hígado en una lesión aguda por cualquier causa origina una serie de cambios, los cuales provocan procesos que conducen a la formación de fibrosis. Sin embargo, estos cambios deben terminar en una forma ordenada para que se complete el proceso de regeneración, pero si la regulación de ese proceso se encuentra alterada, los componentes de la matriz extracelular que participan en la reparación se

acumularán, provocando la formación de una cicatriz fibrosa.

Una vez iniciado el proceso de la fibrosis es difícil su interrupción, y hoy en día sólo disponemos de información a nivel experimental de ciertas condiciones en que la misma puede ser reabsorbida. Su establecimiento origina múltiples y variadas consecuencias fisiopatológicas y clínicas, que deterioran de manera importante la calidad de vida de los pacientes, llegando incluso a ser causa directa de muerte.

Este es el caso de la hipertensión portal, la cual ocasiona que se desarrollen varices esofágicas en el 30 al 70% de los casos, de los cuales entre el 20 y el 40% presentarán hemorragias con una mortalidad del 50% tras el primer episodio de la misma.<sup>30,101,113,147</sup>

Por estas y otras razones, los intentos para obtener un conocimiento amplio de los procesos que acontecen durante la fibrogénesis tienen una importancia primordial. Es posible que estos conocimientos nos permitan algún día intervenir sobre este proceso, con el fin de modificar su curso.<sup>16</sup>

## II. ANTECEDENTES.

### 1.- Anatomía e histología del hígado.

El hígado es el órgano de mayor tamaño en el cuerpo humano, con un peso que oscila entre 1,200 y 1,500 gr. Está situado en el cuadrante superior derecho del abdomen y cumple importantes funciones de síntesis, metabolismo y excreción.

Esta víscera tiene un rico aporte de sangre proporcionado en una parte por la vena porta, y en otra por la arteria hepática, por lo que se mantiene en una estrecha relación con el estado general del organismo, participando en forma importante en su homeostasis.

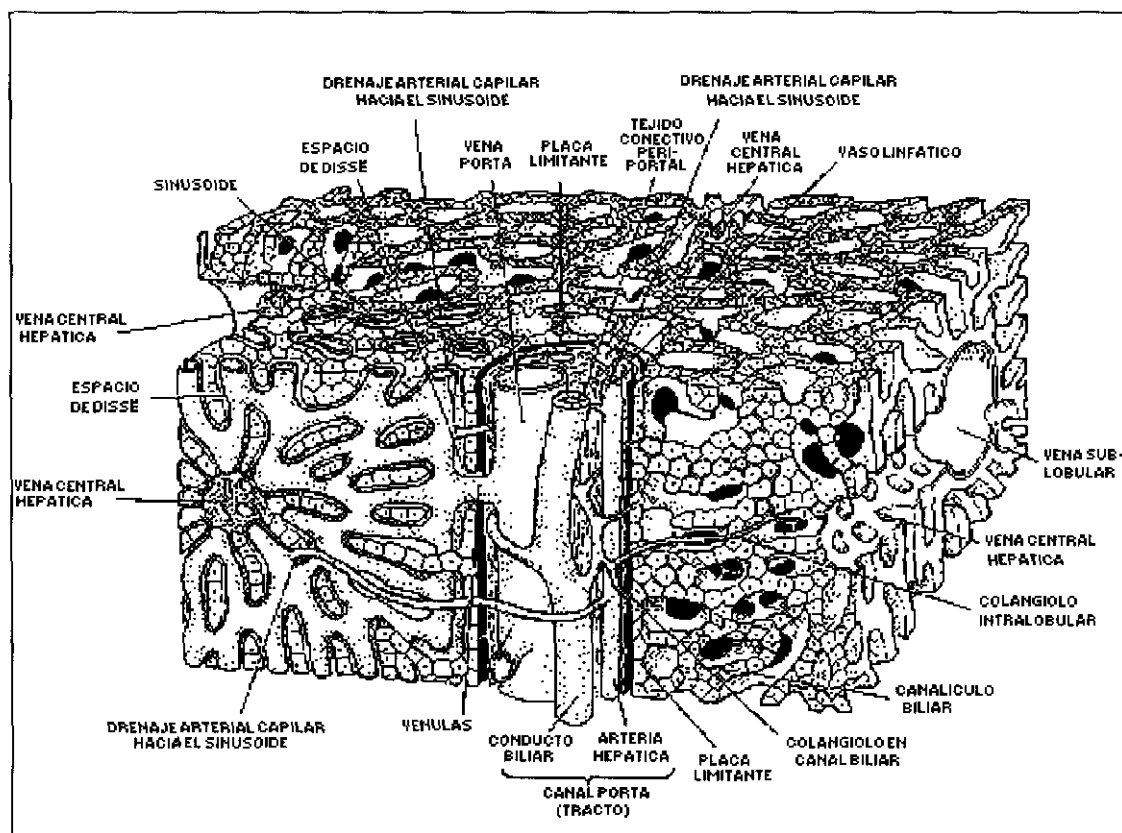


Ilustración 1. Estructura del hígado humano normal. (Sherlock y Doodley, 1993)

En su estructura se ha considerado al lobulillo hepático como unidad básica, lo cual fue referido inicialmente por Kiernan en 1833; él describió áreas circunscritas con forma piramidal, las cuales contaban con una vena central tributaria de la vena hepática y en la periferia un tracto portal que contenía un conducto biliar, una vena porta y un brazo arterial hepático, situándose entre estas estructuras columnas de células hepáticas y sinusoides con contenido de sangre.

El concepto actual de la estructura del parénquima hepático es el de dos sistemas de túneles (los tractos portales y los canales centrales hepáticos), cuyos segmentos finales quedan separados aproximadamente 0.5mm y tienden a desplazarse en planos perpendiculares unos de los otros.

Los canales hepáticos centrales contienen radículos de la vena hepática y de su adventicia, y están rodeados por una placa limitante de células hepáticas. Los acinos funcionales están centrados en una "triada porta", la cual contienen el radículo de la vena porta, la arteriola hepática y el conducto biliar, con pocas células y un tejido conectivo, rodeadas por una placa limitante de células hepáticas.<sup>144</sup>

## **2.- Composición celular del hígado.**

Existen aproximadamente  $202 \times 10^3$  células en cada miligramo de hígado humano normal, de las cuales  $171 \times 10^3$  son del parénquima y  $31 \times 10^3$  son de los sinusoides; ellas componen una compleja red estructural y funcional, en la cual están estrechamente interrelacionadas.



Entre las células que componen al parénquima se encuentran los **HEPATOCITOS**, que corresponden al 60% del total del total de las mismas y que representan el 87% del volumen de los lóbulos.

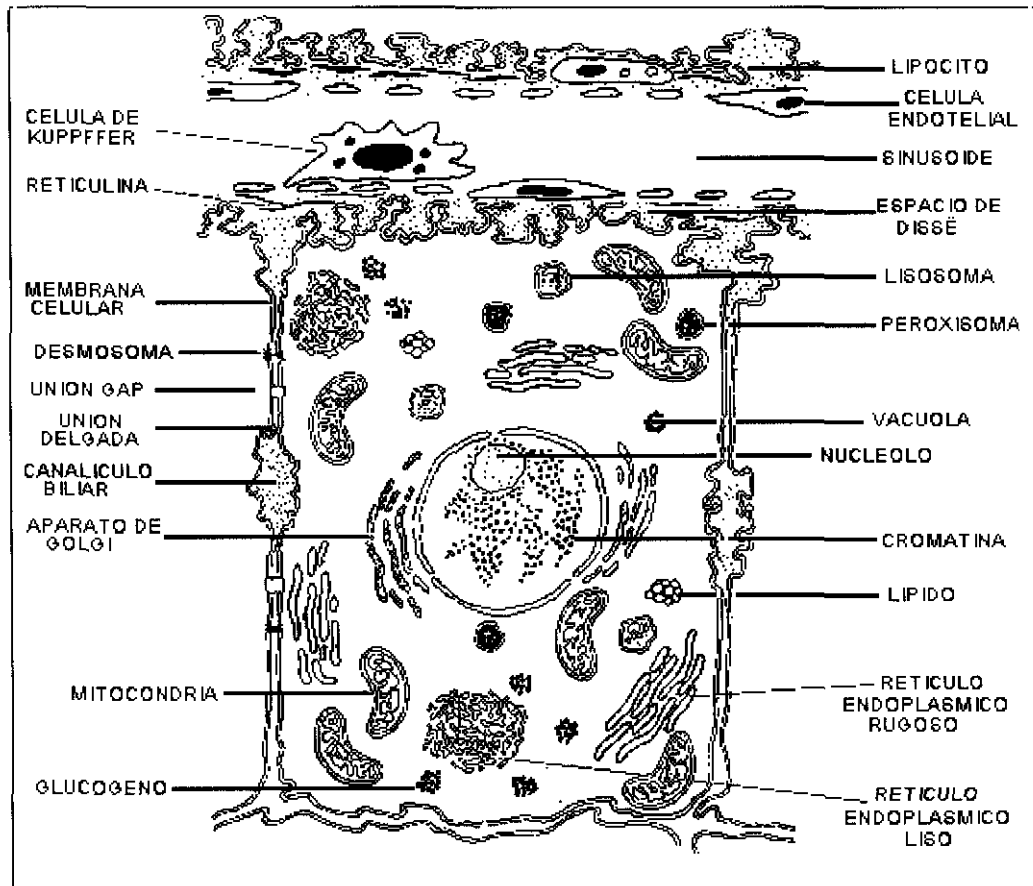


Ilustración 2. Composición celular del hígado, y estructura microscópica. (Sherlock y Doodley, 1993)

Estas células tienen un diámetro de alrededor de 30  $\mu\text{m}$ , su núcleo puede ser único o múltiple y tienen división por mitosis y una vida media de 150 días. Presentan tres superficies: una hacia el sinusoides y el espacio de Disse (que es el espacio entre los hepatocitos y las células de cobertura de los sinusoides), otra hacia el canalículo y una tercera en relación a otro hepatocito, sin que exista una membrana basal.

Inicialmente se les había considerado como la unidad primaria funcional del hígado ya que, al ser aislados y mantenidos en suspensión, conservaban prácticamente todas sus funciones. Sin embargo, en cultivos primarios se ha demostrado que, a pesar de que se les proporcione medio de cultivo completo, no son capaces de mantenerse por si mismos. Esto se atribuye a la falta de factores hormonales plasmáticos e intercelulares, y a alteraciones en la expresión genética en la matriz extracelular.

Actualmente se tiene el concepto de que la unidad funcional hepática es el acino hepático, esto es, una columna de hepatocitos unidos con células mesenquimatosas y matriz extracelular.<sup>20</sup>

Otras de las células que forman a los sinusoides son las **CÉLULAS DE KUPFFER**, que pertenecen al sistema retículo - endotelial y son derivadas de los monocitos sanguíneos. Estas células son muy móviles, y presentan receptores de membrana específicos para ligandinas (incluyendo la porción Fc de las inmunoglobulinas y el componente del complemento C3) los cuales son importantes para la presentación de los antígenos.

Dentro de sus funciones, están las de fagocitar células viejas, partículas extrañas, células tumorales, bacterias, levaduras, virus y parásitos. Además, endocitan endotoxinas y en respuesta secretan una serie de factores como son el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Interleuquinas, Colagenasa y Hidrolasas Lisosomales; así mismo, secretan metabolitos del ácido araquidónico que incluyen prostaglandinas.

En la misma área se encuentra otro componente celular, que son las

**CÉLULAS ENDOTELIALES;** ellas tienen una forma sésil, y se encuentran formando una pared continua hacia la luz de los sinusoides, la cual presenta fenestraciones de 0.1µm de diámetro a través de las cuales se realiza un intercambio de líquidos y partículas entre el espacio de Dissè y los hepatocitos, actuando como barredoras de enzimas peligrosas y patógenos.

Por último, los **LIPOCITOS** o **CÉLULAS DE ITO** son células ubicadas en el espacio de Dissè entre los hepatocitos y las células endoteliales. Representan el 20% del volumen de las células sinusoidales y, aunque pueden contener grasa, se considera entre sus principales funciones el almacenar el exceso de vitamina A y otros retinoides así como otras vitaminas liposolubles.<sup>72</sup>

En presencia de daño de los hepatocitos los lipocitos se activan y, al parecer en respuesta a un Factor Proliferador producido por los primeros,<sup>65</sup> migran a la zona 3 donde se transforman y pierden sus depósitos intracelulares.

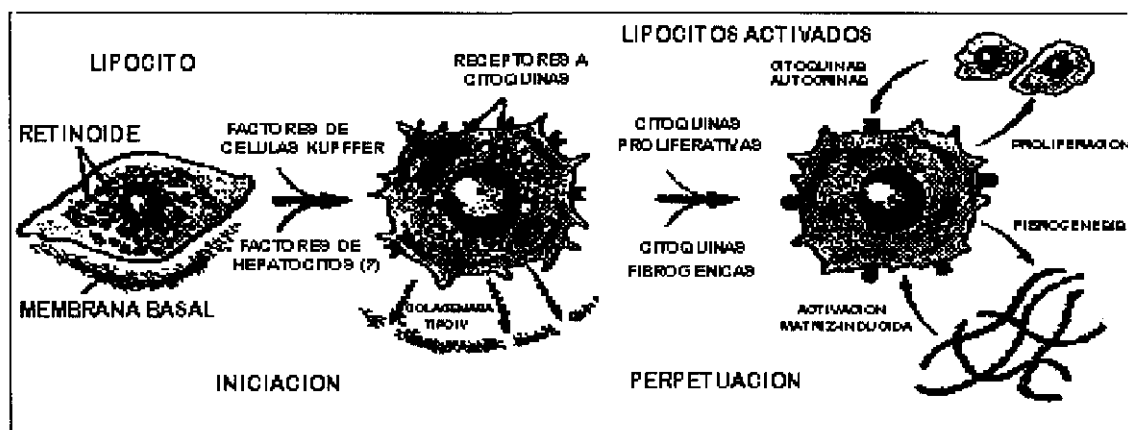


Ilustración 3. Modelo de la activación de los lipocitos hepáticos. (Friedman, 1993)

Una vez ahí, transforman su estructura a otra que recuerda a la de los fibroblastos y se convierten en la principal fuente de matriz extracelular (principalmente de colágeno tipo I, III, IV y laminina); además, pueden regular el flujo sanguíneo sinusoidal y de ese modo contribuir a la hipertensión portal.<sup>15,56</sup>

Es por estas transformaciones y por haberse documentado que en cultivo presentan características de miofibroblastos, que se considera a estas células como las indicadas para estudiar, in vitro, los mecanismos que regulan la biosíntesis de colágeno.<sup>61,63,175</sup>

### 3.- Componentes de la matriz extracelular del hígado.

Las membranas basales son matrices extracelulares compuestas de colágeno tipo IV y de proteínas no colágenas; en el hígado de los humanos, los principales componentes de las mismas se encuentran dentro del espacio de Dissè o en su periferia pero, aunque algunos de sus

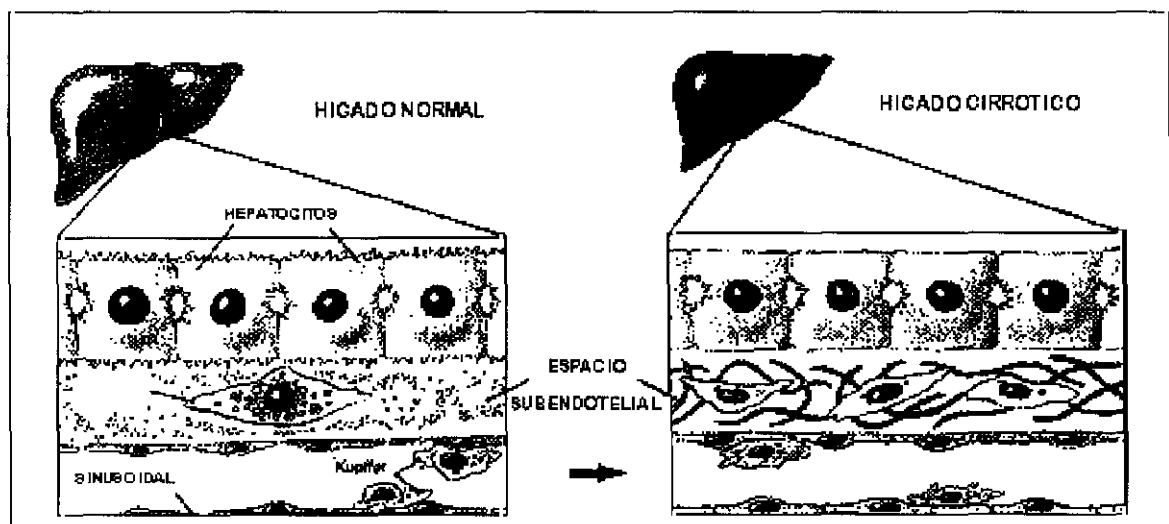


Ilustración 4. Cambios en el espacio subendotelial durante la lesión fibrosa del hígado. (Friedman, 1993)

componentes (como el colágeno tipo IV que hemos mencionado) se encuentren presentes, estos pueden NO estar en contacto con los hepatocitos.

Desde el año de 1963 se han publicado estudios que identifican la existencia de cambios en la distribución de las membranas basales entre hígados normales y fibrosos, los cuales pueden causar severas restricciones en la función normal del hígado.<sup>23,68,156</sup>

Al final de la década de los años setenta se identificó que, en condiciones patológicas, existía un aumento en los depósitos de los colágenos tipos I y III en las áreas periportales e intralobulillares.<sup>172</sup>

En la actualidad se acepta que unas estructuras similares a las membranas basales rodean la superficie perisinusoidal en el hígado normal, aunque no es posible detectar una membrana basal típica ni aún con microscopio electrónico.<sup>68</sup>

Los componentes de la matriz extracelular son los siguientes:

### **PROTEÍNAS.**

*COLÁGENO:* I, III, IV, V, VI, VIII.

*ELASTINA.*

### **GLICOCONJUGADOS.**

*GLICOPROTEÍNAS ESTRUCTURALES:* fibronectina, laminina, undulina, nidógeno, tenascina, osteonectina.

*PROTEOGLICANOS:* heparán sulfato, condroitín 4-sulfato, condroitín 6-sulfato, dermatán sulfato.

### **GLICOSAMINOGLICANOS.**

Entre ellos, destacan por su importancia la laminina, la fibronectina, el heparán sulfato, el proteoglicano y las proteínas colágenas, los cuales pasaremos a revisar con mayor profundidad a continuación.<sup>16,20,68</sup>

#### **A) Laminina.**

La laminina es un polímero producido primariamente por los lipocitos,<sup>20</sup> el cual está formado por subunidades monoméricas de 200 y 400kDa con una unión disulfuro.

Este polímero se detecta en la membrana basal, donde está co-distribuido únicamente con colágeno tipo IV y juega un papel importante en la morfogénesis y organización que se desarrolla durante la regeneración del hígado, ya que se une tanto al colágeno tipo IV como al heparán sulfato.

La laminina tiene que ser considerada como el mejor marcador de las membranas basales, siendo posible identificarla con la utilización de anticuerpos.

Como hemos dicho, no es posible encontrar una membrana basal perisinusoidal ni aún con microscopía electrónica.<sup>17,68</sup> La laminina no se detecta en los sinusoides humanos normales, pero en condiciones patológicas se identifica en las áreas periseptales y periportales. En estas condiciones, la microscopía electrónica si demuestra membranas basales típicas, estado que se denomina capilarización sinusoidal.<sup>17,156</sup> En el hígado graso alcohólico es evidente un aumento en la laminina aún antes de que la fibrosis esté establecida.<sup>68</sup>

## **B) Fibronectina.**

La fibronectina es una glicoproteína que se puede identificar a lo largo de los sinusoides y alrededor de las estructuras portales. Está constituida por dos subunidades de 200kDa cada una, unidas sólo por un puente disulfuro cercano al C terminal.

Se ha identificado una forma celular y una plasmática que, aunque surgen del mismo gen, poseen distinto RNAm, teniendo la forma celular un mayor número de aminoácidos que la forma plasmática.

La fibronectina sérica es producida en el hígado y participa en múltiples acciones, como por ejemplo, en la agregación plaquetaria, en las reacciones de coagulación, en la fijación de la fibrina a las lesiones, en la fagocitosis, en el aumento de la proliferación y migración celular. En las hepatopatías crónicas se encuentra una fuerte reacción positiva a la fibronectina, localizada en la periferia de los espacios portales afectados, en los septos y en las áreas periportales con necrosis, donde los sinusoides se encuentran aumentados de tamaño y ocupados con material que también es positivo a la fibronectina.<sup>17,68,138</sup>

## **C) Proteoglicanos.**

Los proteoglicanos (anteriormente conocidos como mucopolisacáridos) representan el segundo componente en importancia de la matriz extracelular. Son secretados tanto por los lipocitos como por los hepatocitos, y están constituidos por un eje proteico unido en forma covalente a un

glicosaminoglicano.

El principal proteoglicano en el hígado normal es el heparán sulfato, el cual tiene un peso molecular de 750,000 daltons, dando la apariencia de estar anclado en la superficie de los hepatocitos, donde interactúa con la laminina y la fibronectina, participando en forma importante en la regulación de la proliferación y organización del tejido.

La información sobre la localización de este proteoglicano está basada en modelos experimentales en ratas, donde se ha identificado (en los hígados normales) en las membranas basales portales y en los sinusoides.

En etapas tempranas de la fibrogénesis, se distribuye junto con la fibronectina, marcando la interfase entre las áreas septales y las parenquimatosas; en las etapas de fibrosis avanzada ya no es posible detectarlo en los septos por lo que podría ser considerado como un marcador de tejido fibrótico activo "joven", o de fibrogénesis; sin embargo, hasta ahora no se ha logrado obtener un marcador que se pueda utilizar en tejidos humanos.

#### **D) Colágeno.**

Los colágenos pertenecen a una familia heterogénea de proteínas. En la terminología moderna se designan con una numeración progresiva, y en la actualidad se reconoce la existencia de aproximadamente 15, todos ellos productos de genes distintos; difieren entre sí por su contenido de aminoácidos, por la secuencia primaria de los mismos y por su reactividad



inmunológica.

En el hígado se han identificado las proteínas colágenas de los tipos I, III, IV, V y VI (las del tipo II son propias del cartílago).<sup>163</sup> Los colágenos hepáticos pueden ser sintetizados y secretados por los lipocitos, los cuales muestran un incremento de esa actividad durante el desarrollo de la cirrosis hepática. Sin embargo, se ha demostrado que el colágeno también puede ser sintetizado por las células endoteliales de los sinusoides y por los hepatocitos.

Esta última afirmación está basada en estudios in vitro, pero se trata de un punto aún en controversia. En cualquier caso, de ser cierto, lo más probable es que la contribución de los hepatocitos sea bastante modesta.<sup>30,20,58,129,169</sup>

Aunque posteriormente trataremos en detalle el proceso de síntesis del colágeno, es importante que por el momento tengamos presente que estas proteínas son sintetizadas en las células como procolágenos.

Los procolágenos son cadenas de polipéptidos, cada una de las cuales se denomina  $\alpha$ , las cuales aún no tiene la forma de hélice que caracteriza a las proteínas colágenas. Tras su síntesis, los procolágenos sufren diversos cambios que conducen a que estas cadenas se enrollen a lo largo de sus moléculas formando una hélice, excepto en sus extremos N- y C- terminales.

Esos extremos son las llamadas porciones globulares, las cuales contribuyen a mantener estas proteínas en forma hidrosoluble; son eliminados con la participación de dos diferentes proteasas, precipitando la proteína y haciendo que las moléculas de colágeno se alineen con una periodicidad

característica de 660-Å, formándose las típicas fibras de colágeno.<sup>92</sup>

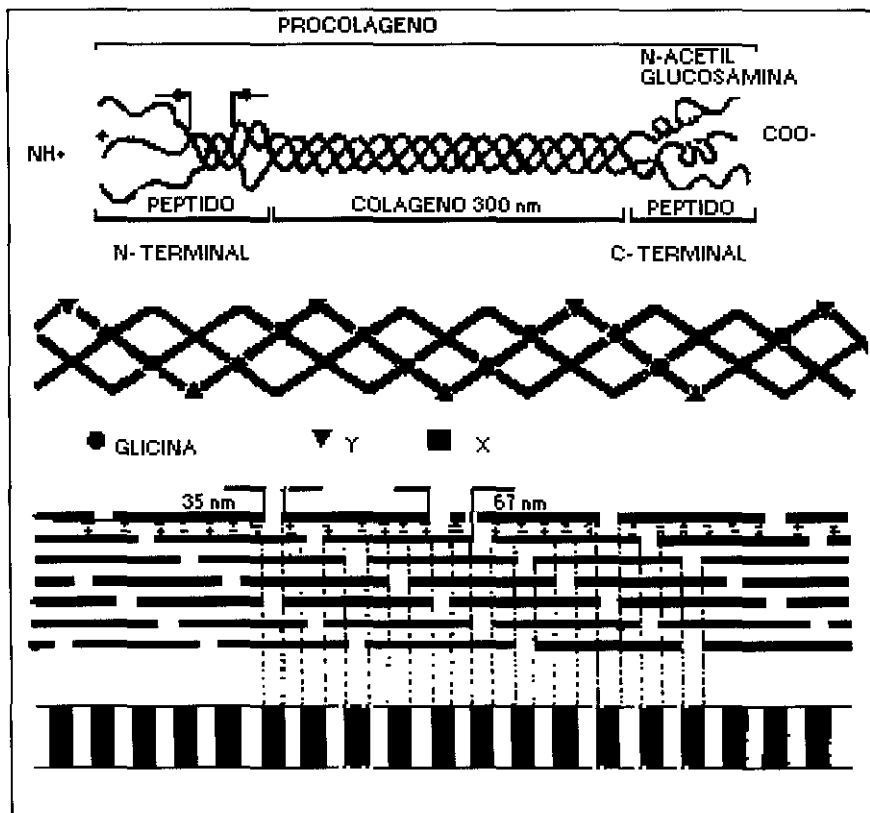


Ilustración 5. Estructura de la molécula de colágeno. (Solís Herruzo, 1988)

Cuando los procolágenos están ensamblados, la proteína tiene un peso aproximado de 95,000 daltons con una estructura de triple hélice, lo que le confiere fortaleza a la tensión y resistencia a la extensión; las tres cadenas de polipéptidos presentan una secuencia repetitiva peculiar de Gli-X-Y, donde es frecuente que el aminoácido en la posición X corresponda a prolina, mientras que el que se encuentra en la posición Y tiende a ser hidroxiprolina (cuando esta se encuentra presente).<sup>16</sup> El largo de los dominios helicoidales varía desde 45 aminoácidos en los colágenos tipos I y II, hasta 1,500 aminoácidos en el tipo VII.

Se estima que el colágeno hepático representa entre 2 y 8mg/g de peso de tejido, o entre 20 y 80mg/g de proteínas,<sup>152</sup> con una distribución que habitualmente tiene el 33% de colágeno tipo I y una cantidad similar a la de tipo III, mientras que el restante 33% pertenece a las proteínas colágenas de las membranas basales. Las proteínas colágenas de los tipos IV, V y VI son componentes menores en el hígado normal, pero en ocasiones pueden aumentar hasta en 8 o 10 veces su valor normal, lo que repercute sobre la cantidad de colágeno total.

Como hemos mencionado, las proteínas colágenas están formadas por tres cadenas de polipéptidos, las cuales son características para cada tipo. Así, el colágeno tipo I es una molécula híbrida que consta de dos cadenas  $\alpha_1(I)$  y una  $\alpha_2(I)$ ; el colágeno tipo III se compone de tres cadenas  $\alpha_1(III)$ .<sup>140</sup> Ambos se encuentran en los canales centrales y en los espacios de Dissë y raramente en el parénquima normal.

El colágeno tipo VI se distribuye, junto con los dos anteriores, tanto en el tejido normal como en el patológico.<sup>174</sup> Las cadenas del colágeno tipo IV son mas grandes que las de los colágenos intersticiales. En el tejido normal se localiza en las membranas basales que se encuentran en los espacios porta y a lo largo de los sinusoides.

En el hígado normal, el colágeno tipo V se relaciona con las células del músculo liso mientras que en los tejidos patológicos está ampliamente representado en los tractos portales, septos fibrosos y se incrementa en los sinusoides.<sup>17,68</sup>

#### **4.- Fibrogénesis y matriz extracelular hepática.**

La matriz extracelular no debe ser considerada como una clase de cemento biológico que forma una estructura pasiva, sino como la causa y efecto de una condición biológica o biopatológica, que provee a los componentes celulares del tejido de una organización, citodiferenciación y control de la síntesis específica de sus componentes, de su crecimiento, de la adhesión y de los fenómenos de migración celular.<sup>16</sup>

Estos fenómenos de activación dan la apariencia de que acontecen en al menos dos pasos diferentes. En el primero, se desarrollan eventos tempranos durante los cuales las células crecen, proliferan y se activan, aumentando la respuesta a mensajeros celulares proliferativos y fibrogénicos. En el segundo, estos fenómenos se perpetúan y se modifica la matriz extracelular.

Así, la matriz extracelular actúa como un brazo efector activo en la modificación de la arquitectura de los tejidos durante el proceso de reparación.<sup>16,56,60,102</sup>

El término fibrogénesis se refiere al proceso de síntesis de matriz extracelular, mientras que el de fibrosis indica la situación estática resultante del balance entre la producción y degradación de esta matriz.

Aunque la fibrogénesis debe ser considerada como una respuesta reparadora normal que finaliza de forma ordenada, cuando este proceso se ve modificado, se pueden presentar alteraciones entre las que se ha descrito el incremento de la matriz extracelular, con una elevación desproporcionada de

todas las moléculas que la componen.

En forma adicional se producen cambios específicos en la microcomposición de algunas de estas moléculas. Como ejemplos, se presentan variaciones en el grado de hidroxilación de las cadenas  $\alpha$  de los colágenos, y en el número y grado de sulfatación de los glicosaminoglicanos presentes en los proteoglicanos.

Estos cambios de composición dan lugar a que se produzcan depósitos tempranos e importantes de la matriz extracelular, tanto en el espacio de Disse (fibrosis perisinusoidal) como en otras zonas (fibrosis periportal, difusa y local),<sup>56,64</sup> formando una cicatriz, la cual puede llegar a organizarse como nódulos de regeneración.

Además, se pueden desarrollar alteraciones de las conexiones vasculares, lo cual se considera como un punto de no retorno, con desplazamiento del tejido funcional normal por una cantidad excesiva de matriz que ocasiona la disfunción del tejido y el órgano. El mecanismo de acumulación de las fracciones mayoritarias de esta matriz implican una activación de su biosíntesis de novo en las células hepáticas.<sup>173</sup>

Se han estudiado las interacciones específicas que existen entre los diferentes componentes de la matriz extracelular (tales como glicoproteínas, colágenos y proteoglicanos).

Se ha observado que dichos componentes unidos a receptores celulares pueden desencadenar actividades celulares y también servir como un nido para mediadores de la inflamación, manteniendo la lesión en un

estado activo.

Los receptores celulares pueden ser considerados como mediadores de la interacción biofuncional entre los microambientes intracelulares (en particular los citoesqueletos) y la matriz extracelular. Por ello se puede considerar que, dado que las células producen incrementos de matriz, la fibrosis es un proceso con auto-mantenimiento.<sup>16,102</sup>

Sin embargo, aún no se conoce cual es la secuencia completa de las alteraciones en los distintos componentes de la matriz extracelular hepática. En modelos experimentales de cirrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono, se ha observado que la primera modificación es una alteración en la distribución y cuantía de la fibronectina, mediada al parecer por una cascada de efectos de mensajeros celulares;<sup>67</sup> después se presentan modificaciones en las proteínas colágenas, inicialmente con incrementos en la tipo I y posteriormente en la III y la IV, y finalmente se encuentran alteraciones en la laminina.<sup>104,110,136</sup>

Todas las células hepáticas (hepatocitos, células de conductos biliares, endoteliales, de Kupffer y de Ito) han demostrado en cultivo su habilidad para producir uno o mas componentes de la matriz extracelular,<sup>16,56</sup> lo cual tiene influencia en la función hepatocelular afectando tanto la expresión de genes de tejidos específicos como la regeneración hepática.

Aunque se había considerado a los hepatocitos como productores de colágeno, se ha comprobado que esta función es secundaria, teniendo mas importancia su producción de fibronectina.<sup>111,116</sup>

Por el contrario, las células de Ito parecen ser las principales productoras de las proteínas colágenas intersticiales. Por esta razón, son las *protagonistas centrales en el proceso de fibrogénesis.*<sup>55,93</sup>

La fibrogénesis se desarrolla generalmente como una respuesta inflamatoria, donde resulta de mayor importancia la secuencia de eventos que se originan como réplica a diversos estímulos; se liberan diversos péptidos y se producen linfoquinas y monoquinas, las cuales parecen ser las responsables de la desorganización y/o la perpetuación de esta respuesta.

#### **5.- Regulación de la matriz extracelular.**

El metabolismo de la matriz extracelular está controlado por una serie de factores que actúan sobre las células que los sintetizan (como los fibroblastos), y a su vez estos factores son producidos por una variedad de células presentes en los sitios de inflamación y/o reparación, tales como los linfocitos activados y macrófagos.<sup>108</sup>

Al parecer, estos mediadores endógenos actúan "in vivo" en forma armónica, como elementos de una red homeostática balanceada y extremadamente compleja, cuyas cantidades de eficiencia relativa, producción e inhibición varían de acuerdo a los requerimientos de la matriz extracelular en distintas condiciones de remodelado.<sup>3,41,108</sup>

Los ajustes de la homeostasis pueden ser beneficiosos sólo dentro de unos márgenes muy estrechos. Cuando existe deficiencia o exceso de los mediadores, estos pueden contribuir al agravamiento de la enfermedad. La

modulación, por su comportamiento con respuestas en ocasiones a distancia del sitio inicial de lesión, es de carácter humoral.<sup>28,39,89</sup>

Dentro de estos mediadores se encuentran las citoquinas. Estas son péptidos y proteínas que median en la interrelación de las células; se les ha identificado como un mecanismo esencial de comunicación, tanto en condiciones normales como de defensa ante diversos agentes.<sup>2,28,57,137</sup> Entre ellas se establecen redes complejas de comunicación e interacciones, en las que es frecuente que se establezcan mecanismos de citoquina a citoquina e incluso sistemas complejos de retroalimentación.<sup>43</sup>

El conocer los efectos que producen ha permitido utilizar a las citoquinas como indicadores de la respuestas inflamatorias,<sup>130,137</sup> como agentes terapéuticos directos (como es el caso del Interferón- $\gamma$ ), bloquear su acción con inhibidores específicos de las mismas (como el propuesto uso de anticuerpos neutralizantes a las citoquinas, a los antagonistas de los receptores de ellas, etc.). En todos los casos se busca que el mensaje obtenido sea adecuado para contrarrestar los mecanismos patológicos.<sup>3,56,149</sup>

Las citoquinas usualmente actúan en el organismo en concentraciones picomolares, a través de receptores específicos por los que presentan alta afinidad. En contraste con las hormonas clásicas, actúan principalmente en forma autócrina o parácrina, pero también pueden actuar de una manera endocrina en células a distancia.

En general, una sola citoquina puede ser producida por una variedad de células, ser la respuesta a diferentes estímulos y tener múltiples efectos



biológicos en diferentes células. Las citoquinas pueden interactuar de una manera positiva o negativa a distintos niveles, tanto por interregulación entre ellas como por respuesta de las células sobre las que actúan.<sup>3</sup>

Estos mensajeros celulares han sido estudiados principalmente en su participación en la respuesta inflamatoria, en la respuesta inmunológica y en la respuesta a agentes infecciosos, así como en la interrelación que entre ellas guardan y sus efectos sobre uno o mas sistemas del organismo.<sup>39</sup>

### **6.- Citoquinas inflamatorias y fibrosis hepática.**

Las citoquinas tienen un papel principal en la respuesta inflamatoria, donde se ha identificado que participan el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la Interleuquina 1 (IL-1), el Factor Transformador del Crecimiento (TGF-1), la Interleuquina 6 (IL-6) y el Factor Inhibidor de Leucemia. Además, en este mismo proceso (inflamación) se han encontrado presentes algunos antagonistas específicos a algunas de estas citoquinas, como por ejemplo para la IL-1 y el TNF.<sup>5,28,39,59,132,170</sup>

Es de hacer notar que existe una estrecha interrelación entre algunas de estas citoquinas, que pueden desencadenar efectos similares u opuestos a los que originan otras de ellas; incluso, pueden ser capaces de autoestimular su secreción o provocar secreción de otras, lo que indica lo complejo de su regulación y equilibrio.<sup>44</sup>

La respuesta de fase aguda es aquella que desarrolla el organismo ante alteraciones de su homeostasis debidas a procesos inflamatorios, lesión

tisular, crecimiento tumoral o alteraciones inmunológicas.

Esta respuesta se caracteriza por fiebre, leucocitosis, aumento de la permeabilidad vascular y de la tasa de sedimentación globular, activación del complemento y de la cascada de la coagulación, disminución de los niveles séricos de hierro y zinc, balance nitrogenado negativo y síntesis hepática de algunas proteínas que son llamadas de fase aguda, entre las que se incluyen al fibrinógeno, la  $\alpha$ 1-antitripsina, la  $\alpha$ 1-antiquimiotripsina, la haptoglobina, la proteína C reactiva, la proteína amiloide A, etc. Se considera que todos estos efectos están encaminados a la defensa del huésped frente a las agresiones.<sup>28,87,71,130</sup>

Los pacientes con hepatopatías inflamatorias activas (en especial de etiología etílica) presentan manifestaciones de respuesta de fase aguda,<sup>128</sup> con tasas elevadas de IL-6 en sangre y sobreproducción de TNF $\alpha$  y de IL-6 por las células mononucleares.<sup>25,41,42,89,117,171</sup>

De las citoquinas que hemos hecho mención, se ha encontrado que la IL-6 se expresa intensamente en el hígado, tanto en las células inflamatorias que infiltran los espacios portales<sup>85</sup> como en las células endoteliales de los sinusoides próximos a los hepatocitos dañados, en las células de Ito e incluso en los mismos hepatocitos.<sup>61,94</sup>

Se ha encontrado que la IL-6 puede inducir un aumento en la cuantía del RNAm de procolágeno  $\alpha_1$ (I) en cultivos de células de Ito,<sup>62</sup> y se ha sugerido el mismo efecto in vivo, pero los mecanismos exactos de este proceso y su repercusión en la síntesis de colágeno está aún sin clarificar.



proteína G en la cara citoplásmica de la membrana plasmática. Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  están bastante conservadas entre las distintas proteínas G, mientras que la subunidad  $\alpha$  es estructuralmente heterogénea y media distintas actividades.

En su forma inactiva, la proteína G es un trímero que presenta el GDP unido a la subunidad  $\alpha$ . Su activación se origina por su unión al complejo agonista-receptor, provocando que se altere el sitio de unión al guanilnucleótido (en el complejo  $G\alpha$ ), permitiendo que el GTP desplace al GDP de la cadena  $G\alpha$ . La unión del GTP causa la disociación de  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  y la cadena  $G\alpha$  inicia la respuesta celular. En menos de un segundo, la cadena  $G\alpha$  hidroliza el GTP a GDP y  $P_i$ , y se reasocia con el complejo  $G\beta\gamma$ .<sup>2</sup>

En función de su sensibilidad a enzimas ADP-ribosilantes, las proteínas G se clasificaron inicialmente en cuatro grupos, los cuales son:

- las que sólo eran sensibles a la toxina colérica,
- las que sólo eran sensibles a la toxina pertussis,
- las sensibles a ambas,
- las que no eran sensibles a ninguna de ellas.

El grupo de proteínas G que eran sustrato de la toxina colérica parecían estimular solamente a la adenilato ciclasa, mientras que las de la toxina pertussis la inhibían, por lo que fueron llamadas  $G_s$  y  $G_i$ . Posteriormente se comprobó que estas proteínas tienen un espectro de acción mucho más amplio, el cual incluye a el metabolismo de los fosfolípidos y a la regulación

del transporte iónico. Sin embargo, la clasificación en la función de la sensibilidad a estas toxinas se sigue manteniendo, ya que los dos primeros grupos presentan analogías estructurales.<sup>124</sup>

### **B) Vía del ácido araquidónico.**

La fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) es una enzima acoplada a los distintos receptores de membrana, mediante proteínas G,<sup>161</sup> y además de ser activada directamente por ellas, en algunos casos puede también ser estimulada como resultado de un aumento en el intercambio de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (posiblemente por modificación del pH intracelular), o por un aumento de los niveles del Ca<sup>++</sup> (se trata de una enzima dependiente del calcio).<sup>165</sup>

Después de su activación, la PLA<sub>2</sub> hidroliza los fosfolípidos de membrana, liberando el ácido graso unido al C<sub>2</sub>, el cual generalmente es insaturado; el otro producto de esta reacción, el fosfolípido, está determinado por la especificidad intracelular que muestra la PLA<sub>2</sub> por la cabeza hidrofílica de los fosfolípidos. Los fosfolípidos principalmente metabolizados por la PLA<sub>2</sub> son la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina.<sup>155</sup>

Los fosfolípidos son detergentes biológicos de las membranas celulares. Además, tanto los ácidos grasos libres como los lisofosfolípidos tienen, en principio, la capacidad de actuar sobre el potencial de membrana mitocondrial donde alteran la actividad de las enzimas que integran esas membranas así como el transporte de calcio a través de ellas.<sup>155</sup>

El ácido graso insaturado más importante en la transducción de señal (y

también el más estudiado) es el ácido araquidónico (AA).

El AA es liberado en su mayor parte por la acción de la PLA<sub>2</sub> sobre los fosfolípidos de membrana, pero también puede desprenderse por la acción secuencial de distintas enzimas, como son la fosfolipasa C (PLC), la diacilglicerol lipasa (DAG lipasa) y la monoacilglicerol lipasa; también pueden participar otras reacciones enzimáticas en las que interviene la fosfolipasa D (PLD). El ácido araquidónico puede interactuar con algunas enzimas (como la PKC), y también es capaz de incrementar el flujo intracelular de calcio.<sup>19,31,82,107,120</sup>

La metabolización del AA puede producirse por diversas vías:

-Por la vía de la cicloxigenasa (CO), dando lugar a las prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y prostaciclina. Entre las acciones de las PG y de los TX se encuentra el incremento en los niveles de AMPc y la activación de la PLC.<sup>9,10,164</sup>

-Por la vía de la lipoxigenasa (LO), cuyos productos son los leucotrienos, lipoxinas y epoxilinas.<sup>82</sup>

-Por la vía del citocromo P-450, originándose epóxidos y alcoholes de ácidos grasos. Estos metabolitos tienen consecuencias importantes en la permeabilidad iónica de las membranas, y en la actividad de enzimas localizadas en las mismas.<sup>29</sup>

### **C) Vía de la fosfolipasa C.**

Otra posibilidad de señalización a través de las proteínas G es que ellas estén acopladas a una fosfolipasa C (PLC). Esta enzima es la encargada de degradar los fosfolípidos de membrana y ha sido implicada en el control de

numerosas funciones celulares. La PLC hidroliza los fosfatidilinositoles (PI-PLC) y la fosfatidilcolina (PC-PLC) de la membrana celular.<sup>103</sup>

La activación de las distintas fosfolipasas C puede deberse a la interacción directa con las proteínas G, o a la estimulación por segundos mensajeros, tales como la PKC, o el  $\text{Ca}^{++}$  citosólico libre.<sup>14,18,48</sup>

Las PI-PLC son una familia de isoenzimas dependientes del calcio citosólico. La hidrólisis del inositol 1,3-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) es la más importante, aunque es el fosfoinosítido menos frecuente.<sup>145</sup> Cuando la proteína G activa la PI-PLC, esta rompe el  $\text{PIP}_2$  en menos de un segundo, generando dos productos: el inositoltrifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y el diacilglicerol (DAG),<sup>13</sup> aunque la liberación de este último (DAG) se produce sólo durante un corto período de tiempo.<sup>40</sup> En ese paso, la ruta señalizadora se bifurca en dos ramas, debido a que ambas moléculas son capaces de activar otros procesos.

La PI-PLC se ve inhibida con neomicina, gentamicina y con quinacrina, aunque las dos últimas inhiben también a la  $\text{PLA}_2$ .<sup>18,54</sup>

La PC-PLC es una enzima que causa hidrólisis de la PC y es responsable, junto con la PLD, de la formación sostenida de DAG. El requerimiento de  $\text{Ca}^{++}$  respecto a la hidrólisis de PC mediada por receptor puede variar entre distintos tipos celulares. En cualquier caso, el metabolismo de este ion parece ser necesario para la hidrólisis correcta de la PC.<sup>18</sup> La acción de la PC-PLC da lugar a la producción de DAG y a fosfocolina.

La PC-PLC es sensible a la inhibición con gentamicina (inhibidor de la  $\text{PLA}_1$ , de la  $\text{PLA}_2$  y de la PLC).<sup>54</sup> El BPB (también inhibidor de la  $\text{PLA}_2$ ) parece

que es capaz de inhibir la PC-PLC independiente de Calcio.<sup>103</sup>

Otra enzima capaz de hidrolizar a los fosfolípidos de membrana es la fosfolipasa D (PLD), cuya actividad depende fundamentalmente del tipo de sustrato,<sup>79</sup> pero no parece tener relación con el calcio.<sup>18</sup> Esta enzima genera ácido fosfatídico (y colina, generalmente), el cual puede ser una fuente importante de DAG al sufrir la acción de una fosfohidrolasa. Además, se ha descrito que este ácido es capaz de movilizar calcio intracelular, de abrir canales de calcio, de inhibir la adenilatociclasa, o incluso de activar la PLA<sub>2</sub> y la PLC.<sup>18,48,114</sup>

La actividad de la PLD puede detectarse tempranamente, después de la estimulación específica de algunas células,<sup>18</sup> o ser secundaria a la acción de la PKC.<sup>38</sup>

#### **D) Calcio.**

El calcio libre intracelular es un segundo mensajero utilizado por numerosos agonistas. La concentración de calcio en el citoplasma puede incrementarse tanto por su liberación desde almacenes intracelulares, como por un flujo desde el espacio extracelular a través de membranas plasmáticas.<sup>46</sup>

Los niveles de calcio intracelular son bajos cuando se comparan con la concentración de este ion en el fluido extracelular ( $10^{-7}M$  y  $10^{-3}M$ , respectivamente). Sin embargo, el calcio total dentro de la célula es mucho mayor que  $10^{-7}M$ , debido a que existe mucho calcio unido a proteínas,



membranas y otros componentes celulares, como son el retículo endoplásmico, la mitocondria, el aparato de Golgi y el núcleo, siendo los dos primeros de estos organelos los que están implicados en los cambios agudos de la distribución del calcio intracelular.

Los niveles de calcio intracelular pueden incrementarse en respuesta al  $IP_3$ , el cual se une a una proteína receptora en la superficie citoplásmica del compartimiento intracelular (retículo endoplásmico, fundamentalmente) y abre canales de calcio en esa membrana.<sup>81</sup>

La respuesta del calcio al  $IP_3$  es transitoria debido a que el calcio que entra en el citosol es bombeado rápidamente hacia fuera de la célula y porque gran parte del  $IP_3$  es defosforilado rápidamente por una fosfatasa específica, y por tanto, es inactivado.

Los niveles de calcio citoplasmático libre pueden estar regulados por otras moléculas señalizadoras. Por ejemplo, es posible que el calcio intracelular se incremente por vía de canales de calcio unidos a receptor, por canales de calcio sensibles a voltaje,<sup>98</sup> por la acción del ácido fosfatídico y del ácido araquidónico,<sup>18,66,114</sup> por la activación de canales de calcio dependientes de voltaje por la PKC<sup>88</sup> o por incremento en los niveles de AMPc.<sup>112</sup>

### **E) Diacilglicerol.**

El diacilglicerol (DAG) es un segundo mensajero que puede generarse por la acción directa de las fosfolipasas PI-PLC y PC-PLC sobre los fosfolípidos de membrana. Además de originarse por este mecanismo, el DAG puede ser

producido por otras rutas diferentes, como son:

- por la hidrólisis de glicerofosfolípidos de colina, debida a la acción de la fosfolipasa D y de la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico;<sup>48,18,40,103</sup>
- por el intercambio ceramida/PC;<sup>40</sup>
- por la síntesis de novo.<sup>154</sup>

El DAG puede ser fosforilado por la DAG quinasa, con lo cual se reinicia la síntesis de los fosfatidilinositoles rotos por la PLC, los cuales controlan la concentración del DAG; de esta forma se regularía la PKC.<sup>86</sup> Además, el DAG puede sufrir la acción secuencial de la 1-DAG-lipasa y de la 2-monoacilglicerol-lipasa, liberándose AA. Sin embargo, parece que la liberación de AA a partir de DAG es una ruta minoritaria.<sup>107</sup>

La vía mas importante que inicia el DAG en la transducción de la señal es la activación de una proteinkinasa específica, la cual fosforila numerosas proteínas y se conoce como proteinkinasa C (PKC).<sup>11,12,127</sup>

Hasta el momento se han identificado nueve miembros de la familia de la PKC. En su región reguladora presentan una estructura de aminoácidos que se asemeja al substrato proteico, y una o dos regiones ricas en cisteína que recuerdan la estructura de "dedo de zinc". Esta región contiene el sitio de unión a los ésteres de forbol y al DAG, y segmentos que interaccionan con los fosfolípidos. También es la región que confiere la dependencia al calcio en los subtipos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La región catalítica presenta los sitios de unión al ATP y a la

proteína. Los inhibidores de la PKC estaurosporina y H7 interaccionan con esta región.<sup>12</sup>

El DAG producido, junto con el fosfolípido de la membrana plasmática (denominado fosfatidilserina) se unen a la PKC, incrementando su afinidad por el calcio y haciendo que la PKC se active con las concentraciones normalmente bajas de  $\text{Ca}^{++}$  en el citosol. Sin embargo, en muchas células parece que la PKC se activa por el efecto cooperativo del DAG y un incremento del  $\text{Ca}^{++}$  citosólico.

La activación de la kinasa C es transitoria, ya que en unos segundos el DAG es desfosforilado para formar fosfatidato. Cuando se activa la PKC por el DAG y el  $\text{Ca}^{++}$ , esta enzima transfiere el grupo fosfato terminal desde el ATP hacia un residuo específico de serina o treonina, que se encuentran en las proteínas diana y que varían dependiendo de la célula.

Se piensa que en algunas células animales, la PKC se fosforila y posteriormente activa al antiportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática que controla el pH intracelular;<sup>9,165</sup> el incremento de pH resultante puede ayudar a estimular la proliferación celular. Existen niveles elevados de PKC en el cerebro, participando en diversas funciones entre las cuales esta la fosforilación de canales iónicos en células nerviosas.

La PKC también está implicada en la regulación de otras rutas señalizadoras, como son la del calcio y la del AMPc, en el control negativo de varios receptores, y en la transcripción de genes específicos. Los promotores de algunos de estos genes presentan un intensificador transcripcional común,

el cual es reconocido por una proteína reguladora del gen, cuya actividad está estimulada por la activación de la PKC.

Sin embargo, aún no se sabe si la proteína es desfosforilada directamente (y por ello, activada) por la PKC, o si es activada indirectamente por una cascada de proteinquinasas.<sup>49</sup>

#### **F) Vía de la adenilato ciclasa.**

Como ya se ha indicado, en un gran número de sistemas y en respuesta a diferentes agonistas, las proteínas G transmiten la señal que se inicia tras la unión del agonista a su receptor, activando una enzima situada en la membrana plasmática, la adenilato ciclasa (AC).

Esta enzima sintetiza AMPc a partir de ATP. El AMPc se degrada a adenosín-5'-monofosfato (5'AMP) en forma continua y rápida, a través de una o más fosfodiesteras de AMPc.

Dado que en este caso la proteína G está involucrada en la activación enzimática, se denomina proteína G estimuladora ( $G_s$ ). Cuando la proteína  $G_s$  está activada por el complejo agonista-receptor, se une una molécula de GTP y se activa la AC. La  $G_s$  mantiene a la AC activa durante tanto tiempo como el GTP esté intacto, y cuando la proteína  $G_s$  hidroliza el GTP a GDP, finaliza la activación de la ciclasa.

La proteína  $G_s$  permite dos tipos de amplificación de señal:

-uno de estos tipos es cuando una proteína receptora sencilla puede, en principio, activar muchas moléculas de proteínas G colindantes,

activando así numerosas moléculas de AC;

-sin embargo, en algunos casos el ligando extracelular puede no mantenerse unido a su receptor el tiempo suficiente como para permitir que este mecanismo tenga lugar; la proteína  $G_s$  es capaz de mantenerse activa por si misma durante 10 o 15 segundos antes de hidrolizar el GTP unido y, en este caso, la AC puede estar activada después de que el ligando extracelular se ha dissociado.

Además de la amplificación, las proteínas G permiten una regulación del proceso de activación. En principio, la eficacia del acoplamiento entre receptores y enzima pueden alterarse por una modificación covalente de la proteína G, o por un cambio en su concentración en la membrana plasmática.

La toxina del cólera es una enzima que cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el  $NAD^+$  intracelular a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, impidiendo que esta proteína G hidrolice su GTP unido, por lo que esta proteína  $G_s$  permanece alterada indefinidamente.

La misma molécula señalizadora puede incrementar o disminuir la concentración de AMPc intracelular, dependiendo del tipo de receptor al que se una. La diferencia se debe a que las proteínas G que acoplan estos receptores a la ciclase presentan idénticos complejos  $G\beta\gamma$ , pero tienen una subunidad  $G\alpha$  inhibitoria ( $G_i\alpha$ ).

Cuando se activan los receptores acoplados a estas proteínas G inhibitorias, se disocian las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ , y la  $G_i\alpha$  inhibe directamente a

la AC mientras que el complejo  $G\beta\gamma$  actúa indirectamente por su unión con subunidades  $G_s$  libres, previniendo así su unión a moléculas de ciclasa.<sup>2</sup>

La proteinquinasa A (PKA) media la acción del AMPc. La PKA presenta una *región catalítica con la que interacciona el H-8, inhibidor de esta enzima.*

La PKA es capaz de fosforilar numerosas proteínas y presenta interacciones con otras rutas de segundos mensajeros. Por ejemplo, en algunas ocasiones aumenta la sensibilidad del receptor de  $IP_3$  de los almacenes intracelulares de calcio, y de esta forma potencian la liberación de calcio intracelular inducida por distintos agonistas.<sup>24</sup>

En general, las modificaciones inducidas por los sistemas de señales sobre la expresión genética están mediadas por terceros mensajeros que suelen corresponder a factores nucleares transactivadores, los cuales en algunas ocasiones son proteínas que ya existen en las células y son activadas, en otras son proteínas de nueva síntesis y en algunas mas se trata de una anulación de proteínas inhibitorias.

En cualquier caso, estos factores transactivadores se fijan a secuencias específicas *cis-activadoras del DNA, modificando su expresión genética.*

### **8.- Biosíntesis de colágeno.**

Aunque con anterioridad hemos mencionado algunos de los eventos y características de las proteínas colágenas, dado que son el elemento con

mayor relevancia en el proceso de la fibrosis, cabe hacer un repaso mayor.

#### **A) Generalidades.**

La síntesis de los diferentes tipos de colágenos está regulada en al menos 24 genes distintos. Así, el gen de la cadena  $\alpha_1(I)$  del colágeno está situado en el cromosoma 17, el de la  $\alpha_2(I)$  en el cromosoma 7, el de la  $\alpha_1(II)$  en el 12 y el de la  $\alpha_1(III)$  en el 2, en cuyo brazo largo también se ha localizado el gen de la cadena  $\alpha_2(V)$ , mientras que las cadenas  $\alpha_1(IV)$  y  $\alpha_2(IV)$  son vecinos en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 13.

La secuencia completa del promotor de procolágeno  $\alpha_1(I)$  de rata tiene una extensión aproximada de 3.6kb, con un alto grado de homología entre las secuencias humana y murina, y semejanzas con los promotores de otros tipos de colágeno.<sup>36,69</sup>

La información genética almacenada en el DNA de los genes mencionados debe ser transcrita a través de un RNA para finalmente expresarse en la síntesis de proteínas. Se ha encontrado que numerosos factores de transcripción modulan la síntesis del RNAm del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , entre ellos el CBF (o NF-1), el cual se une a secuencias CCAAT; al IF-1, que se une a dos secuencias ricas en GC; y al IF-2 (o SP-1), que reconoce una región de 12bp, la cual está formada fundamentalmente por pares GC, con dos secuencias CCAAT.<sup>87</sup>







las reconocidas por el factor NF-1.<sup>148</sup>

Adicionalmente, se encuentra que en la regulación de la expresión de muchos genes que codifican los distintos colágenos, existen elementos activos en el primer intrón. Se ha establecido que existe una gran semejanza entre la secuencia de bases del primer intrón del gen del procolágeno  $\alpha_1(I)$  humano y murino.<sup>69</sup>

La transcripción de DNA a RNA se realiza con la participación de la enzima RNA polimerasa (RNAP), la cual inicia su acción a partir de un punto del DNA que es conocido con el nombre de promotor, el cual permite la fijación de la enzima RNAP al DNA, iniciando la formación del RNA mediante la unión de 2 monómeros de ribonucleasa trifosfato.

El RNA producido es llamado inicialmente heterogéneo nuclear (RNAhn), el cual acepta en su extremo 3' a nucleótidos de adenosina metilada, en número de 100 a 250, al parecer para facilitar la salida del RNA al citoplasma. Además, en su extremo 5' se agrega una 7-metil guanina, la cual es imprescindible para que posteriormente el RNA (convertido en RNAm) se una a los ribosomas.

Por último, la longitud del RNAhn se acorta por la exclusión de fragmentos intermediarios (intrones), y el RNA resultante se conoce como RNA mensajero (RNAm), el cual se unirá a los ribosomas para su expresión.

La transcripción está controlada por proteínas reguladoras, las cuales se pueden unir al área promotora inhibiendo la unión del RNAP, o unirse a un área llamada "facilitadora" que promoverá la transcripción del gen; la

naturaleza y mecanismo exacto de actuación de estas proteínas es desconocido por el momento.

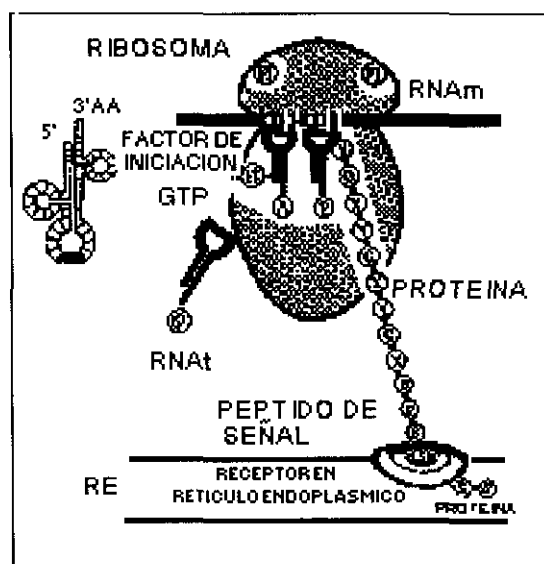


Ilustración 10. Mecanismo de síntesis de proteínas. (Solís Herruzo, 1988)

La determinación genética de la secuencia de aminoácidos en un polipéptido establece su conformación tridimensional, la cual es esencial para la actividad biológica de la proteína.

En el caso del colágeno, la estructura está determinada a dos niveles de organización: en el primer nivel, las tres cadenas de polipéptidos se pliegan longitudinalmente en una molécula con forma de triple hélice, que parece una vara y tiene una longitud de 300nm de largo con sólo 1.5nm de diámetro; en el segundo nivel de organización, se involucran asociaciones longitudinales y laterales de las moléculas en fibrillas.

Cada una de las cadenas que forman la triple hélice son llamadas cadenas  $\alpha$ . Ellas están enrolladas (dando un giro a la izquierda cada tres

aminoácidos) quedando dispuestas en una super-hélice que gira hacia la derecha, para formar una estructura rígida.

Se considera que cada cadena  $\alpha$  contiene residuos de aproximadamente 1,000 aminoácidos, donde la presencia de glicina (el aminoácido mas pequeño) cada tercera posición es crucial, ya que ocupa el sitio en el cual se unen tres cadenas helicoidales  $\alpha$  en el centro de la triple hélice.

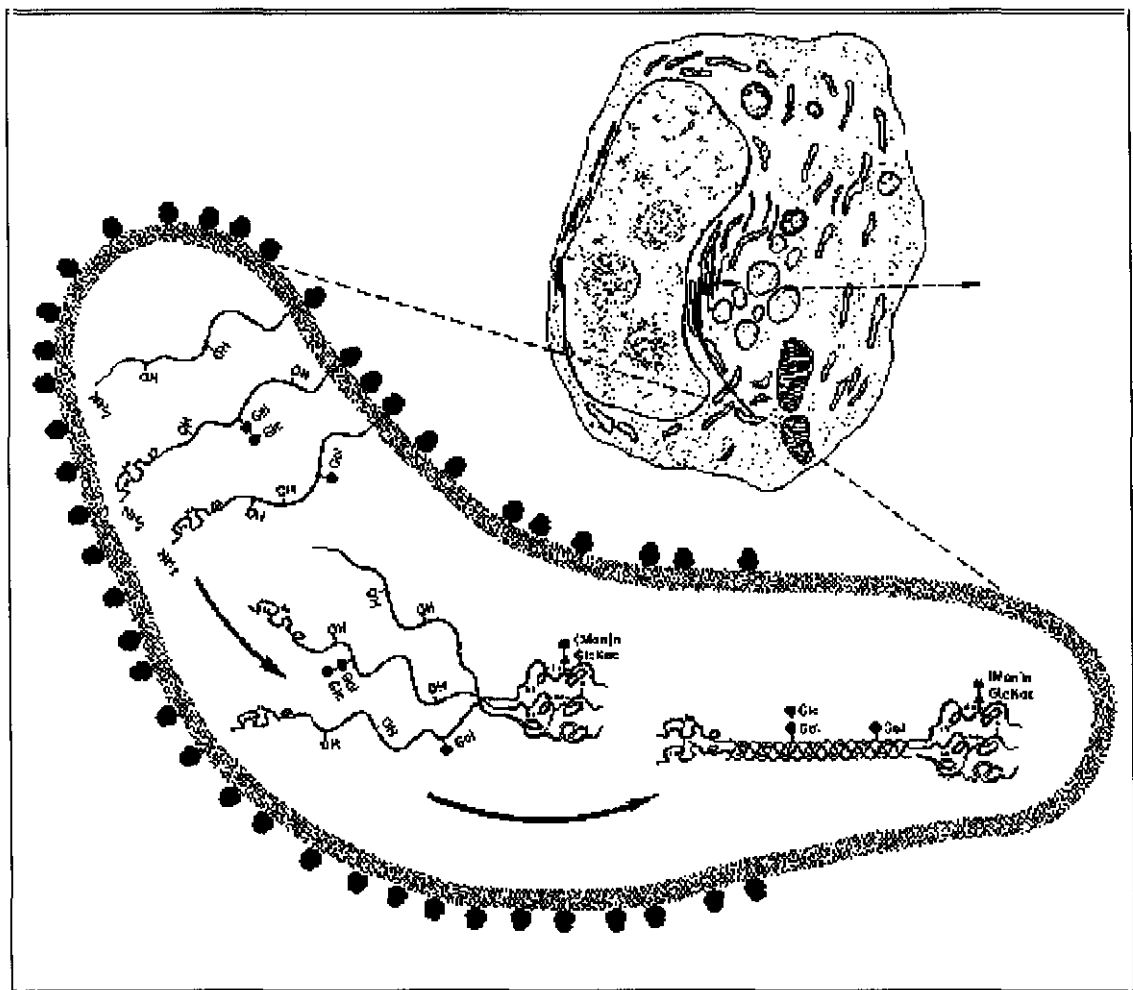


Ilustración 11. Representación esquemática de la síntesis del colágeno en la cisterna del retículo endoplásmico rugoso. (Prockop, 1979)

El colágeno es sintetizado inicialmente en moléculas mayores, llamadas

procolágenos, las cuales hemos descrito con anterioridad. Todas ellas tienen, como característica, extensiones de péptidos a ambos extremos de sus tres cadenas polipeptídicas.

Estas cadenas de polipéptidos en el procolágeno son llamadas cadenas pro- $\alpha$ . En el caso del procolágeno tipo I, los dos polipéptidos son llamados como pro- $\alpha_1(I)$  y pro- $\alpha_2(I)$ .

El propéptido aminoterminal de la cadena pro- $\alpha_1(I)$  tiene un peso molecular de 20,000 daltons y contiene tres estructuras dominantes distintas. La cadena pro- $\alpha_2(I)$  contiene también un propéptido aminoterminal con un dominio similar al colágeno, que se une a la región que es parecida al colágeno en el propéptido aminoterminal pro- $\alpha_1$ .

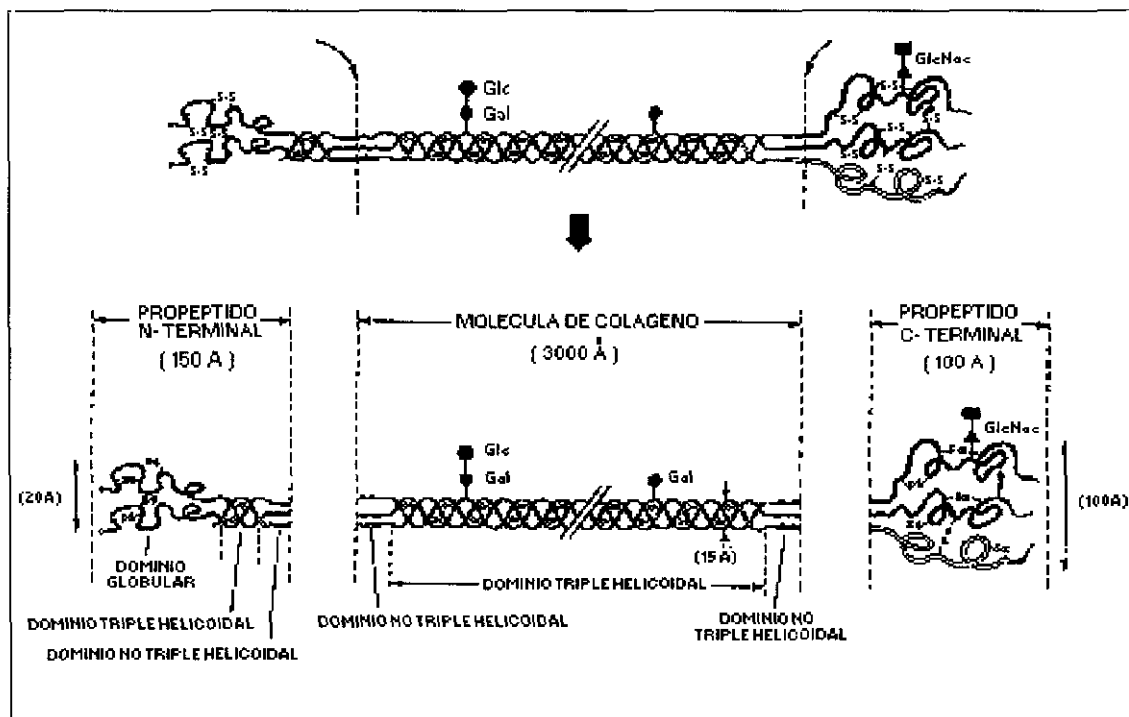


Ilustración 12. Representación esquemática de una molécula de colágeno. (Prockop, 1979)

Los propéptidos carboxil terminales (tanto de las cadenas pro- $\alpha_1$  y pro- $\alpha_2$ ) tienen un peso molecular entre 30,000 y 35,000 daltons, con una *conformación globular sin dominios similares al colágeno*, aunque la estructura primaria del propéptido carboxil terminal de la cadena pro- $\alpha_1$  es diferente de la cadena pro- $\alpha_2$ .

Los propéptidos son un tercio del volumen de la molécula de procolágeno, y en la actualidad se consideran que tienen cinco posibles funciones:

- Pueden prevenir la formación prematura de fibrillas.
- Ayudar al ensamble directo de las proteínas en fibrillas.
- Asociar directamente las cadenas pro- $\alpha$ , para que cada molécula contenga las cadenas pro- $\alpha$  correctas.
- Incrementar tanto la tasa, como la eficiencia de la unión de las cadenas pro- $\alpha$  en una conformación triple helicoidal.
- Pueden funcionar (al estar liberadas de la molécula) dentro de algún tipo de sistema de retroalimentación que controle la cantidad de procolágeno producido por las células.<sup>140</sup>

*En la síntesis de fibrillas de colágeno, tanto los dominios del propéptido como las cadenas pro- $\alpha$  del colágeno son sometidos a extensos procesos de reacciones postraslacionales, los cuales se producen en dos etapas:*

- Una de ellas es intracelular, en la cual se requiere ensamblar y secretar la molécula de procolágeno;

-la otra extracelular, que convierte las moléculas de procolágeno en colágeno y las incorpora en una fibrilla de colágeno con puentes cruzados estables.

### **B) Procesos intracelulares.**

Cuando el amino terminal finaliza la nueva síntesis, las cadenas *pro- $\alpha$*  entran en la cisterna del retículo endoplásmico rugoso, donde aparentemente encuentran una proteasa que retira la secuencia y también encuentran tres enzimas de hidroxilación:

1) La prolil 4-hidroxilasa, que es un tetrámero con un peso molecular de 240,000 daltons; consta de dos tipos de monómeros, con pesos moleculares de 64,000 y 60,000 daltons.

2) La prolil 3-hidroxilasa.

3) La lisil hidroxilasa, un dímero de dos sub-unidades y un peso de 90,000 daltons.

Las dos primeras convierten los residuos prolil a 4-hidroxiprolil y 3-hidroxiprolil respectivamente, y la tercera convierte los residuos lisil a hidroxilisina. Todas estas reacciones están catalizadas por co-factores, que son los iones ferrosos, el oxígeno molecular, el  $\alpha$ -ceto-glutarato y el ácido ascórbico.

Las tres hidroxilaciones se ejecutan sobre sus substratos de acuerdo

con algunos requerimientos inusuales y específicos:

- El residuo hidroxilado debe estar localizado en un péptido.
- Debe ocupar la posición correcta en la secuencia de aminoácidos del péptido.
- El péptido debe tener una conformación NO helicoidal.
- Los péptidos largos se hidroxilan mas fácilmente que los cortos.

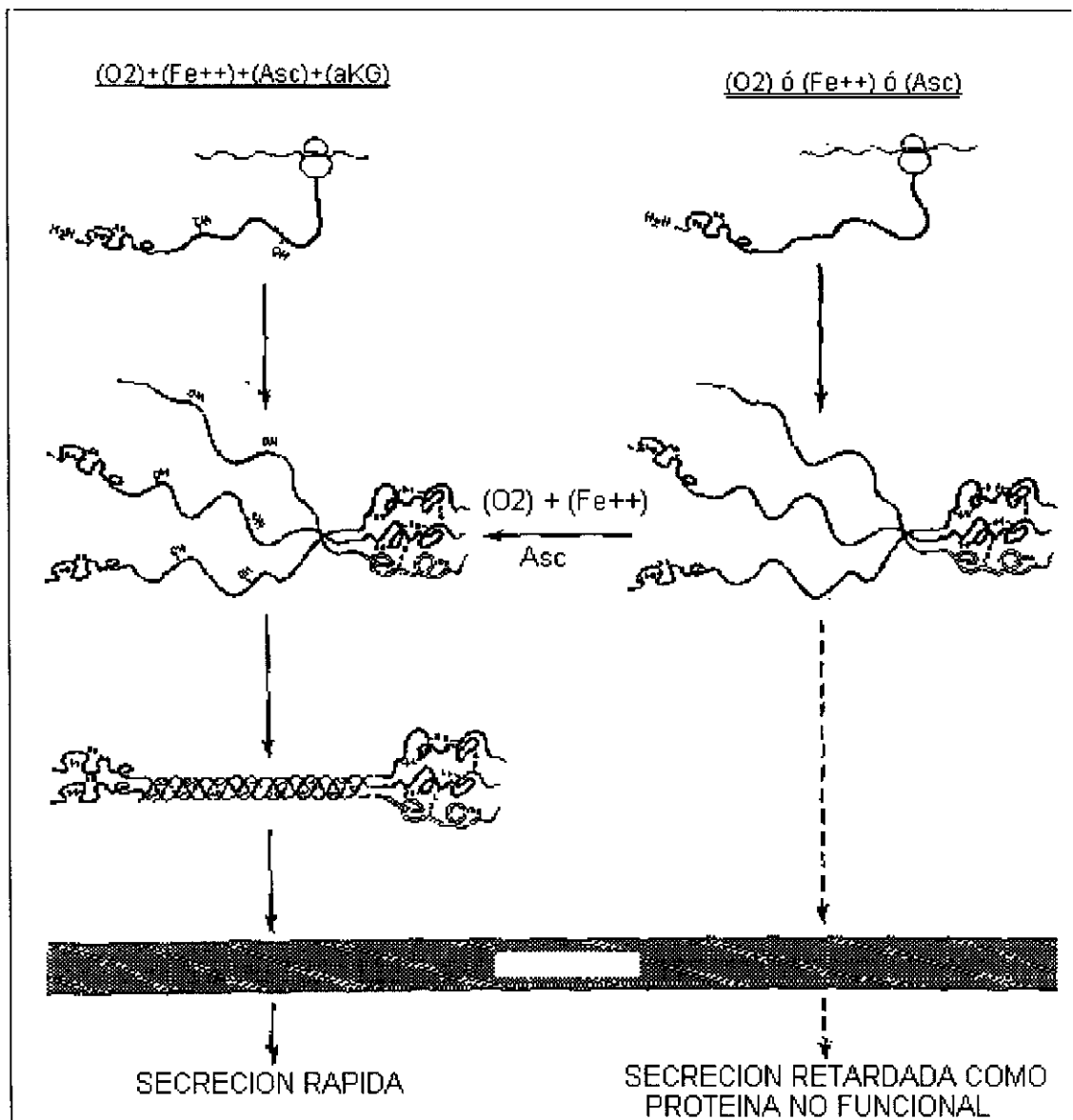


Ilustración 13. Representación esquemática del papel de la hidroxilación posttranslacional y de la conformación helicoidal en la secreción del colágeno. (Prockop, 1979)



Otros pasos importantes en el proceso intracelular de los propéptidos son la síntesis de puentes intracadenas y la formación de las uniones disulfuro intercadenas.

La formación de puentes di-sulfuro intercadena, en el pro-péptido, está relacionada con el procesamiento del dominio del colágeno, ya que los puentes disulfuro intercadena son un requerimiento esencial para plegarse en una triple hélice.

Usualmente la secuencia de los eventos mencionados consiste en la hidroxilación de las cadenas pro- $\alpha$ , la síntesis de los puentes disulfuro intercadena y finalmente la formación de la triple hélice.<sup>140</sup>

### **C) Secreción.**

La secreción del procolágeno es similar a la de otras proteínas sintetizadas para exportación, en la cual la proteína es enrollada en el retículo endoplásmico rugoso y pasa a través del complejo de Golgi antes de dejar las células. La secreción del procolágeno es un ejemplo en el que la tasa de secreción depende del procesamiento intracelular, y específicamente del plegamiento de los dominios de colágeno del pro- $\alpha$  hacia la conformación de la triple hélice.

### **D) Proceso extracelular.**

La conversión de procolágeno a colágeno requiere al menos dos enzimas, las cuales son una aminoproteasa procolágeno que elimina los

aminopropéptidos, y una procolágeno carboxipropeptidasa que elimina los carboxipéptidos; en ambos casos es necesaria la presencia de un metal divalente (como el Calcio).

Las moléculas de colágeno producidas por rotura del procolágeno se ensamblan espontáneamente en fibrillas, las cuales son indistinguibles microscópicamente de las fibras maduras que se encuentran en los tejidos. Sin embargo, las fibras inmaduras no tienen la fuerza de tensión necesaria hasta que adquieren una serie de puentes cruzados, los cuales están formados por uniones covalentes.

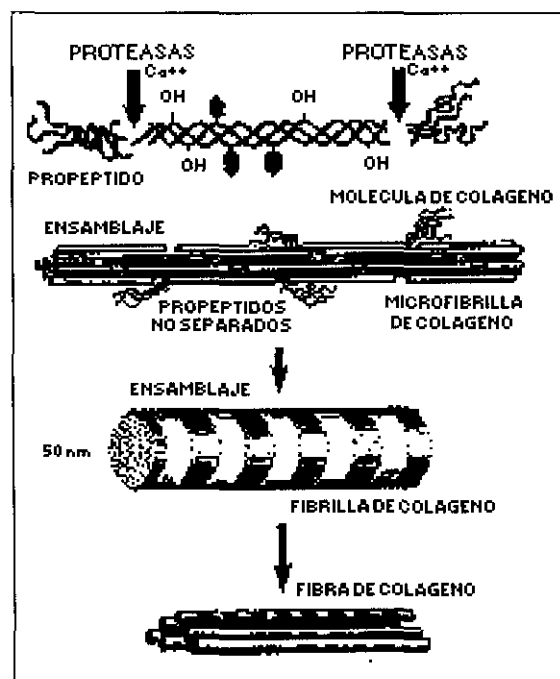


Ilustración 14. Representación esquemática de la transformación de colágeno extracelular. (Solís Herruzo, 1988)

En la formación de las uniones covalentes, se lleva a cabo la deaminación oxidativa de los grupos  $\epsilon$ -amino en ciertos residuos lisil e hidroxilisil del colágeno, produciéndose aldehídos reactivos por la enzima que

cataliza esta reacción, la lisil-oxidasa, que es una proteína que contiene Cobre y reacciona pobremente con cadenas  $\alpha$  aisladas, actuando preferentemente en fibras de colágeno nativo.

Se forman dos clases principales de puentes cruzados. Una es un puente cruzado intramolecular, el cual une las cadenas  $\alpha$  de la misma molécula y está formada por la condensación del aldol de dos aldehídos. La segunda clase de puente cruzado involucra la condensación entre un aldehído derivado de lisina, hidroxilisina y hidroxilisina glicosilada, y un grupo  $\epsilon$ -amino de una segunda lisina, hidroxilisina o hidroxilisina glicosilada.<sup>140</sup>

### **9.- Reabsorción de colágeno.**

La información obtenida en forma experimental y en observaciones clínicas sugiere que, en ciertas condiciones, la fibrosis hepática puede ser reabsorbida, sobre todo cuando los colágenos se encuentran recién sintetizados. Sin embargo, se da por sentado que el tejido conectivo maduro, que tiene sus uniones covalentes cruzadas bien establecidas, es menos sensible a la acción de enzimas degradativas que el tejido recién formado.<sup>16</sup>

Existen dos formas de degradación del colágeno:

- La primera, que es de naturaleza intracelular, funciona tanto para moléculas de naturaleza intra como extracelular e involucra lisosomas, retículo endoplásmico y aparato de Golgi.
- La segunda, de naturaleza extracelular, está a cargo de metaloenzimas dependientes del zinc, las cuales son proteasas del tipo de las

colagenasas, y son hasta el momento motivo de controversia, y se encuentran en estudio.<sup>179</sup>

### A) Colagenasas.

Como hemos dicho, en la degradación del colágeno participan enzimas específicas (colagenasas), las cuales no se encuentran almacenadas sino que son sintetizadas y secretadas al medio extracelular en respuesta de señales precisas.

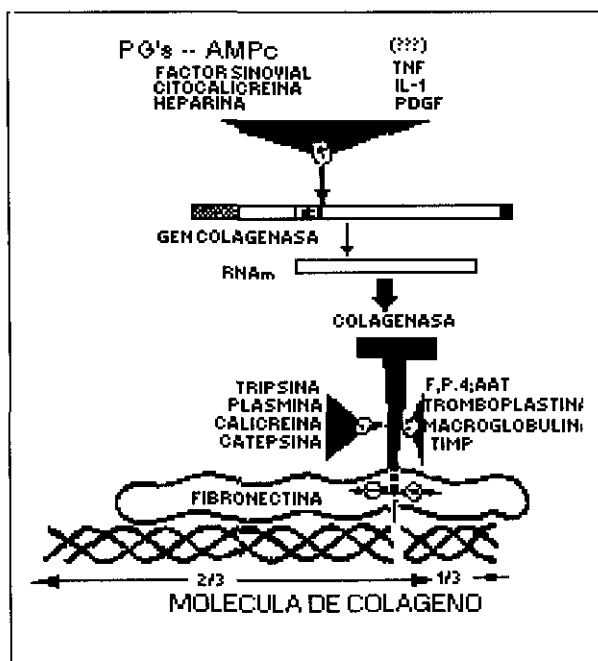


Ilustración 15. Representación esquemática de la acción de las colagenasas sobre fibras de colágeno. (Solís Herruzo, 1988)

Durante el desarrollo de la fibroplastia que se presenta en la lesión hepática crónica, se ha encontrado que la matriz extracelular puede ser degradada como resultado del incremento en la secreción de colagenasas tipo IV por los lipocitos activados.<sup>56</sup>

Este proceso puede llegar a ser tan intenso que incluso se llega a un efecto paradójico, en el cual el aumento en la actividad de estas enzimas (colagenasas) puede llegar a ser superior a la tasa de producción de colágeno. Por tanto, se considera que son ellas las principales responsables del efecto de degradación de esta proteína intersticial.<sup>16,96,105</sup>

Existen tipos específicos de colagenasa para cada una de las proteínas colágenas. Esas enzimas tienen acción a pH neutro, con actividad en sitios específicos de las hélices de cadenas de polipéptidos y, para completar la degradación de estas moléculas de colágeno (en particular en los tipos IV y V), es necesaria la participación de enzimas adicionales (elastasas).

En base a estudios de la función de las colagenasas tipos I, II y III, ahora se sabe que el sitio de acción proteolítica donde se produce la ruptura se encuentra a tres cuartos de la distancia del amino terminal, en el lugar donde la secuencia de aminoácidos es una unión glicina-isoleucina. Esta ruptura produce dos fragmentos, de los cuales el mas grande es llamado TCA y el mas pequeño se TCB. Es posible asumir que hay pérdidas en el sitio de ruptura, ya que existen otras uniones glicina-isoleucina en el colágeno. Se ha demostrado que las enzimas proteolíticas ayudan a la conversión de las colagenasas hacia una forma activa, ya que estas son secretadas en una forma latente.<sup>16,96,131,133</sup>

Las fuentes de colagenasas son las células endoteliales, las células similares a fibroblastos, los monocitos/macrófagos/neutrófilos, e incluso los lipocitos normales.<sup>6</sup> Su producción puede ser estimulada por la síntesis de

agentes inductores de las colagenasas, por la interacción de célula a célula e incluso por la participación de algunas citoquinas.

Entre las citoquinas a las que se ha documentado participación en la producción de la colagenasa se cuentan a la IL-6,<sup>83</sup> la IL-1 y el TNF.<sup>176</sup>

Aunque aún no está establecido cuando un único estímulo es capaz de provocar la producción tanto de colágeno como de colagenasa, es posible asumir que todas las células hepáticas involucradas en el proceso de la fibrosis son capaces de producir eventualmente tanto colagenasas como colágenos.<sup>16,162</sup>

Los complejos mecanismos de regulación de esta dualidad se vuelven mas complicados, debido a la participación de algunas citoquinas (tales como los factores de crecimiento) en la modulación de la síntesis y degradación de todos los componentes de la matriz extracelular, y en especial del colágeno.

Las citoquinas presentan efectos diversos sobre la síntesis de colagenasa, de acuerdo a los distintos tipos celulares que los integran al organismo. Además, la actividad de las colagenasas se encuentra regulada aún mas, debido a que existen factores inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP), que también son producidos en respuesta a citoquinas, pero con un patrón de secreción distinto al de las colagenasas. Se está aceptando cada vez mas que la tasa de degradación de la matriz extracelular representa a la relación colagenasa/factor inhibidor de la colagenasa.<sup>83,146,150,160,179</sup>

## **10.- Interleuquina 6 (IL-6).**

La IL-6 es una citoquina que fue identificada inicialmente en el sobrenadante de cultivos de células mononucleares, las cuales habían sido estimuladas con mitógenos o antígenos, encontrando como su primera función que inducía la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B transformados.<sup>118,177</sup>

Durante su estudio, se le ha denominado de diversas maneras, dependiendo las funciones en que participaba. Así, se ha llamado como Factor Estimulante de Hepatocitos (HSF), Factor-2 Estimulante de Células B (BSF-2), Interferón 2 (IFN-2), Proteína de 26kDa, Factor de Crecimiento de Hibridoma-Plasmocitoma (HPGF), Proteína Inductora de Diferenciación de Células Mieloides Sanguíneas (MGI-2A), lográndose descifrar las secuencias del DNA de algunas de ellas.<sup>75</sup>

En 1987 se sabía que todas estas citoquinas eran idénticas, por lo que se propuso el nombre de Interleucina 6 (IL-6) para denominarlas,<sup>142</sup> lo cual fue plenamente aceptado por la generalidad de los investigadores de este campo, ante la Academia de Ciencias de Nueva York (USA) y la Fundación Nacional para la Investigación de Cáncer (USA) en 1988.

Se trata de una citoquina que participa en múltiples procesos, por lo que se dice que es multifactorial o pleiotrópica.

Entre sus múltiples funciones, se ha encontrado que actúa en la hematopoyesis, donde incrementa la proliferación del progenitor hematopoyético pluripotencial,<sup>90</sup> la respuesta inmune, donde participa en la

regulación de los linfocitos (T y B)<sup>41</sup> y en la respuesta de la inmunidad celular,<sup>27</sup> y en la respuesta de fase aguda, donde es la principal inductora de la misma.<sup>71</sup>

Además, participa en la respuesta inflamatoria, en la infección (localizada en cavidad peritoneal o sistémica),<sup>26,27</sup> en el metabolismo óseo,<sup>153</sup> en el crecimiento de algunas líneas de linfomas,<sup>45</sup> y en otros efectos.<sup>4,90,123,166</sup>

#### **A) Estructura del gen de la IL-6.**

El gen de la IL-6 humana está localizado en el brazo corto del cromosoma 7 p15-p21, y la IL-6 murina en la región proximal del cromosoma 5; ambas constan de 5 exónes y 5 intrones.

Se han encontrado tres sitios de iniciación para la transcripción que son utilizados en distintos tipos celulares. En el límite 5' del gen de la IL-6, entre -225 y -113, existen motivos similares a los elementos reguladores del gen c-fos humano y pueden contener los elementos de actuación cis, los cuales son los principales responsables para la activación del promotor IL-6.

#### **B) Estructura de la proteína IL-6.**

La secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos, obtenida de la clonación de DNAC del RNAm de la IL-6 tanto de fibroblastos humanos, de células T humanas transformadas y de monocitos humanos, resultan idénticos.

El RNAm de 1.3kb se traduce a una proteína precursora de 212



aminoácidos, con una masa molecular de 26kDa. Después de remover un péptido de señal de 28 aminoácidos, la proteína resultante (de 184 aminoácidos) contiene dos sitios posibles de N-glicosilación, siendo N- y O-glicosilada y subsecuentemente secretada. Aunque la IL-6 no glicosilada es biológicamente activa, esas modificaciones post-translacionales pueden tener un papel en las funciones específicas de la citoquina en los tejidos, o en su vida media.

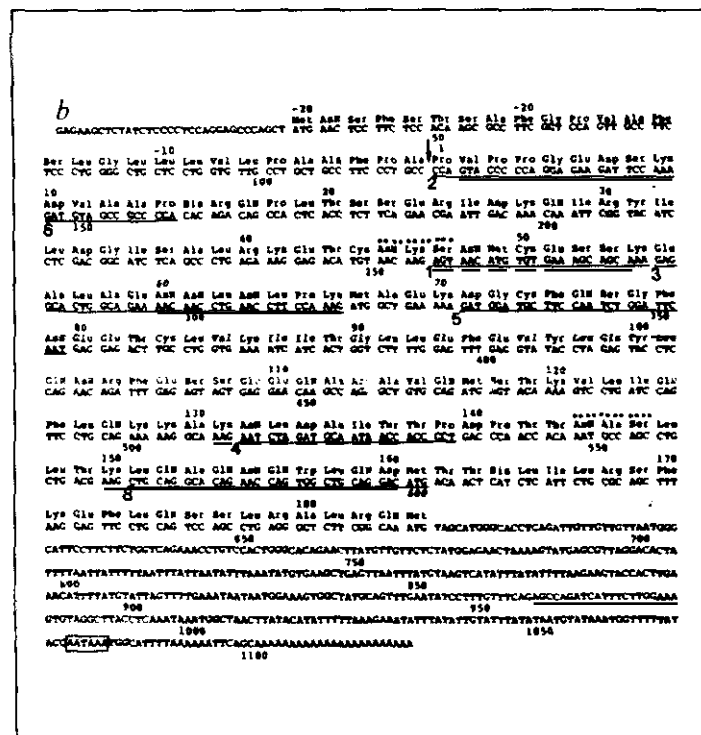


Ilustración 16. Secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia del DNA de IL-6 humana. (Hirano, 1986)

La IL-6 murina contiene 211 aminoácidos los cuales incluyen un péptido de señal de 24 residuos, sin que se hayan identificado N-glicosilaciones, pero en cambio se han encontrado muchas O- glicosilaciones.

A nivel del DNAC existe una similitud de tan solo el 65% entre la IL-6

murina y la humana; esta homología disminuye hasta un 42% a nivel proteico. A pesar de estos niveles bajos de similitud, se debe remarcar que la IL-6 de ambas especies es biológicamente activa en sistemas heterólogos.<sup>71,90</sup>

### **C) Regulación de la biosíntesis de la IL-6.**

Con el estímulo apropiado, esta citoquina es sintetizada por una variedad de células. Entre ellas, se puede mencionar a líneas celulares tumorales, células endoteliales, fibroblastos y monocitos/macrófagos. Incluso, se ha mencionado que las células de Ito transformadas en miofibroblastos (en cultivo) tienen la capacidad de expresar y secretar IL-6 activa.<sup>63</sup> En estos casos, los monocitos/macrófagos son estimulados principalmente por lipopolisacáridos de las bacterias, mientras que los fibroblastos y las células endoteliales responden mejor a las citoquinas endógenas IL-1 y TNF $\alpha$ , que son sintetizadas abundantemente por los macrófagos.<sup>43</sup>

Al parecer, tanto la IL-1 como el TNF $\alpha$  ejercen su acción a través de dos segundos mensajeros (la PKC y el AMPc), con regulación incluso por hormonas esteroideas (la dexametasona inhibe la síntesis de IL-6). En el hígado, la principal fuente de IL-1 y de IL-6 son las células de Kupffer, pero existen evidencias de que también son producidas por las células endoteliales.<sup>51</sup> Finalmente, se ha encontrado que es el hígado el lugar principal de depuración de la mayoría de las citoquinas, entre las que se encuentra la IL-6.<sup>171</sup>

#### **D) Mecanismos de acción de la IL-6.**

La IL-6, al igual de otras citoquinas, ejerce su efecto biológico tras su fijación a receptores específicos presentes en la superficie celular.<sup>90</sup> En el hígado, se ha encontrado distribuida principalmente en las células endoteliales, en áreas con necrosis focal de hepatocitos y en células de Kupffer.<sup>85</sup>

El receptor está compuesto por una proteína de unión de 80kDa (gp80), la cual funciona en la unión de la citoquina al receptor, y una glicoproteína de 130kDa (gp130), la que participa en la transducción de la señal. Existe una interacción entre ambas que es un mecanismo novedoso en la transducción de señal de las interleuquinas.<sup>166</sup>

Estos receptores se han incluido en una superfamilia de receptores, denominados hematopoyéticos,<sup>91,158</sup> los cuales están formados por una proteína con 468 aminoácidos (que incluye un péptido de señal de aproximadamente 19 aminoácidos) y un dominio de 90 aminoácidos, que recuerda a un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas.

La parte citoplasmática de 82 aminoácidos no tiene dominio para tirosinquinasa, como sucede en los receptores de otros factores de crecimiento. Sin embargo, se ha encontrado que la tirosinquinasa puede jugar un papel en la transducción del estímulo de la IL-6 al haber encontrado que aumenta una vez que el estímulo ha pasado a la proteína gp130.<sup>34,119,106,125,166,180</sup>

El número de receptores es de bajo a muy bajo, según se determinó en

múltiples líneas celulares mieloides, de astrocitoma y de células T y B, donde se han encontrado entre 1,000 y menos de 200, pero se sabe poco de los receptores hepáticos para la IL-6. Como ejemplo, en la línea celular de hepatoma HepG2 se encontró que existen aproximadamente 450 receptores de alta afinidad, y 5,000 de baja afinidad.<sup>90,126</sup> Adicionalmente, se ha identificado que existe una forma soluble de proteína gp130 (sgp130), la cual es capaz de regular en forma negativa la señal de la IL-6.<sup>121</sup>

Aunque se consideraba que el mecanismo de degradación de la IL-6 podía ser totalmente distinto, estudios con hepatocitos han encontrado que, posterior a su unión a receptor, la IL-6 es internalizada rápidamente hasta en un 80% por una vía endocítica típica mediada por receptor, y una vez en el medio intracelular, es degradada. Los primeros productos de este metabolismo aparecen en el medio extracelular en 30 minutos, posterior a su endocitosis.<sup>90,126</sup>

Tras su acción en el receptor se generan señales intracelulares que, a pesar de la baja cantidad de receptores, en los hepatocitos presentan una respuesta intensa. Esto indica la existencia de un sistema de amplificación de señal muy eficiente para modificar la expresión genética, pero las vías que participan en la transmisión de esas señales de la membrana celular al núcleo, no han sido aún clarificados.<sup>71,91</sup>

Aunque no demostrado en hepatocitos, en las células B humanas se ha identificado que una de esas vías es una proteinkinasa que se inhibe con H7, pero que es diferente a la proteinkinasa C. Por otra parte se considera que,

dado la variedad de efectos que provoca en distintas líneas celulares (pleiotropismo), es posible que las vías intracelulares pudieran ser distintas, ya que la estructura básica del transductor de señal gp130 es básicamente el mismo.<sup>74</sup>

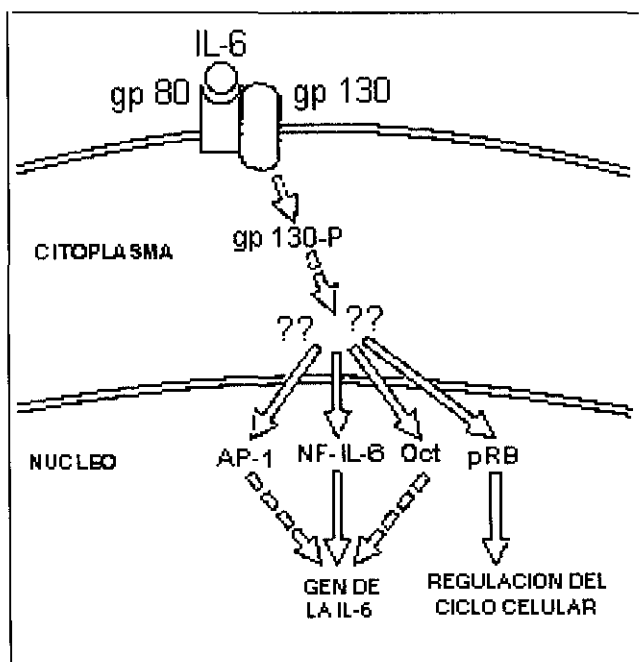


Ilustración 17. Esquema de los mecanismos de señalización de la IL-6. (Chen-Kiang, 1993)

En el núcleo, la IL-6 induce la interacción de factores nucleares específicos (unión de DNA-proteínas), con elementos promotores de respuesta de muchos genes de fase aguda;<sup>3,1</sup> entre estos, se han identificado algunos que pueden ser inducidos por la IL-6 y que median algunas señales de la citoquina al núcleo, tales como el NF-IL6 y el AP-1.<sup>1,78,122</sup>

Aunque se desconoce si el gen del colágeno posee elementos cis-activadores para el NF-IL6, si los hay para el AP-1.<sup>97</sup>

Debido a que aún existen puntos no aclarados en los mecanismos

exactos de señalización, así como de participación de la IL-6 en la síntesis de colágeno, se plantea la presente tesis.

### III. OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto de la interleuquina 6 (IL-6) sobre la fibrogénesis en lipocitos en cultivo.

1.1. Estudiar los mediadores intracelulares que participan en el efecto de la IL-6.

1.1.1 Participación de la proteína G.

1.1.2 Participación de la vía de la fosfolipasa A<sub>2</sub>.

1.1.3 Participación de la vía de la proteinquinasa C.

1.1.4 Participación del Calcio citosólico.

1.1.5 Participación del AMPc.

1.2 Estudiar el efecto de la IL-6 sobre el promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$ .

1.3 Estudiar el efecto de la IL-6 sobre la síntesis de colágeno, realizando mediciones de:

1.3.1 La cantidad de RNAm procolágeno.

1.1.1 La incorporación de prolina a las células.

1.1.2 La hidroxilación de la prolina.

1.1.3 La tasa de secreción del colágeno hacia el medio extracelular.

1.2 Estudiar el efecto de la IL-6 sobre la degradación del colágeno, observando:

1.2.1 El efecto sobre la actividad de la colagenasa.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 1.- MATERIAL.

El estudio se realizó en lipocitos hepáticos obtenidos por el Dr. Rojkind<sup>63</sup> de ratas cirróticas por intoxicación crónica con CCl<sub>4</sub>, cedidos amablemente por él; fueron mantenidos en cultivo en frascos de Roux de 260 o de 750ml, o en placas multipocillo de 25mm de diámetro, obtenidos de la casa NUNC (Roskilde, Dinamarca), utilizando medio de cultivo H-MEM con HEPES 25mmol, 10% de suero fetal inactivado, glutamina 2mM, 1% de aminoácidos no esenciales y 100UI/ml de penicilina-estreptomicina, obtenidos todos de la compañía FLOW (Irvine, Escocia, UK).

Los cultivos y medios fueron manejados con pipetas y material plástico estéril desechable de la compañía COSTAR (Cambridge, MA, EUA), y filtrados a través de filtros de 22µm de la compañía MILLIPORE (Bedford, MA, EUA).

El plásmido COLCAT1 utilizado en los ensayos de transfección y que contiene el promotor del gen del procolágeno  $\alpha_1(I)$  de ratón fusionado con el gen de la cloramfenicol-acetil-transferasa fue cedido generosamente por el Dr. D. A. Brenner (San Diego, CA, EUA); el clon bacteriano HB 101 transformado con el plásmido pBR322, vector del cDNA del procolágeno  $\alpha_1(I)$  de rata, fue cortesía del Dr. Rowe (Connecticut, EUA).<sup>95</sup>

La Interleuquina 6 (IL-6) utilizada fue de la variedad recombinante humana de la casa ENDOGEN (Boston, MA, EUA) en su presentación de 5µg por vial, los cuales fueron reconstituidos en 500µl de PBS de la casa



DULBECO (Costa Mesa, CA, EUA), quedando una concentración final de 10ng/μl.

El siguiente material radioactivo fue utilizado: de la casa AMERSHAM INTERNATIONAL (Amersham, UK) se obtuvo D-threo-(dichloroacetyl-1-<sup>14</sup>C)-Cloramfenicol con actividad específica de 57mCi/mmol; Deoxicitidina-5'-(α-<sup>32</sup>P)-trifosfato con actividad específica de 3,000Ci/mmol; L-(<sup>14</sup>C)-prolina con actividad específica de 264mCi/mmol; L-(5-<sup>3</sup>H)-prolina con actividad específica de 43Ci/mmol; sistema de marcado de DNA MULTIPRIME y membranas de nylon HYBOND<sup>tm</sup>-N; de la casa DU PONT-NEW ENGLAND NUCLEAR se obtuvo (methyl-<sup>3</sup>H)-timidine con actividad específica de 78.5Ci/mmol; L-(4-<sup>3</sup>H)-prolina con actividad específica de 23.2Ci/mmol; (I<sup>125</sup>)IL-6 humano recombinante con actividad específica de (76.3μCi/μg).

La agarosa fue de la compañía BIO-RAD (Richmond, CA, EUA); las películas de autorradiografías de KODAK (de Rochester, NY, EUA); el fenol saturado de APPLIGENE (Illkirch, Francia); el kit para determinación de la Deshidrogenasa Láctica de KNICKERBOCKER (Barcelona, España); la D-luciferina, los oligonucleótidos y el líquido de centelleo Pico-Flúor 40 fue de PACKARD INSTRUMENTS (Downers Grove, IL, EUA); la cloramfenicol-acil-transferasa y la acetil-CoA de BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICALS (Indianapolis, IN, EUA); el agar, la triptona y el extracto de levaduras utilizado para el crecimiento de las bacterias transformadas fue de DIFCO (Detroit, MI, EUA); los solventes orgánicos y las placas de cromatografía en capa fina de sílice fueron de las casas E. MERCK (Darmstadt, Alemania) y SCHARLAU

(Barcelona, España); las toxinas pertussis y cólera, el inhibidor de nucleótidos cíclicos H-8 y el quelante de calcio intracelular Quin-2/AM fueron de CALBIOCHEM (La Jolla, CA, EUA); el resto de los reactivos utilizados fueron de SIGMA (Alcobendas, Madrid, España).

## **2.- MÉTODOS.**

### **A) CULTIVO CELULAR, PROLIFERACIÓN Y CITOTOXICIDAD.**

#### **Cultivo de lipocitos.**

Las células de Ito fueron mantenidas durante 5 días a 37°C en medio H-MEM preparado con los suplementos mencionados, hasta lograr su adhesión al frasco de cultivo y la plena confluencia de las células.

#### **Estímulo de cultivos celulares.**

En los experimentos de cuantificación de RNAm, de transfección y de unión a receptor, los mediadores celulares se añadieron en la concentración indicada en cada caso y se mantuvieron en incubación durante 24hr.

En el estudio de las vías intracelulares de transmisión de estímulo de la IL-6, se utilizaron inhibidores específicos de las mismas, manteniendo una pre-incubación de ambos (lipocitos/inhibidores) durante al menos una hora, y dejando que estos permanecieran presentes durante la incubación completa.

#### **Proliferación celular.**

Esta fue determinada midiendo la incorporación de [6-<sup>3</sup>H]timidina al

DNA de los lipocitos; estos se incubaron durante 24hr en presencia de IL-6 junto con 0.5 $\mu$ Ci/ml de la [6-<sup>3</sup>H]timidina, retirando posteriormente el medio de cultivo, lavando la monocapa celular en 2 ocasiones con PBS frío, para finalmente rasparla.

Posteriormente fue sonicada y el DNA se precipitó con ácido tricloroacético al 10%, siendo centrifugado y lavado nuevamente con el mismo ácido en tres ocasiones mas, disolviéndolo en NaOH a una concentración 0.2N, donde se realizó la medición de la radioactividad presente como un índice de la incorporación de timidina.

#### Citotoxicidad.

Fue estudiada midiendo la actividad de la deshidrogenasa láctica producida por los cultivos celulares a diversas concentraciones de IL-6 y secretada al medio de cultivo.

#### **B) UNIÓN DE LA IL-6 A SU RECEPTOR.**

En cultivos celulares en confluencia se retiró el medio de cultivo, siendo sustituido por H-MEM completo con diferentes concentraciones de [<sup>125</sup>I]IL-6 humano; cuando fue preciso, se agregaron simultáneamente diversas concentraciones de IL-6 recombinante humana no marcada. Después de 24hr de incubación a 4°C, las células fueron lavadas con H-MEM completo y frío en cuatro ocasiones y se solubilizaron con SDS a 0.1%, determinando la radioactividad en un contador gamma.

Se consideró a la unión específica como la diferencia entre la unión total y la no específica en presencia de un exceso de 100 veces de la IL-6 no marcada.

### **C) COLAGENO.**

#### Producción de colágeno.

El efecto de la IL-6 sobre el metabolismo del colágeno se examinó agregando la citoquina (en distintas concentraciones) al cultivo celular en confluencia y manteniéndolo en incubación durante un período de 20hr; después de ese tiempo, se añadió ác. ascórbico 0.2mM como co-factor de prolil/lisil oxidasas, y L-[5-<sup>3</sup>H]prolina 10μCi, permaneciendo en incubación durante 5hr mas, según el método descrito por Holt y col.,<sup>76</sup> terminando el marcado con el enfriamiento de las placas de cultivo a 4°C; posteriormente fueron recolectadas, rompiéndolas mediante el uso de ultrasonido, precipitando las proteínas con ác. tricloroacético al 10% y centrifugando a 3,000rpm durante 10 minutos.

Las proteínas colágenas y no colágenas se determinaron utilizando el método de la colagenasa descrito por Peterkofsky & Diegelmann,<sup>135</sup> con las modificaciones descritas por Chojkier y col.,<sup>35</sup> Peterkofsky y col.<sup>134</sup> y Flaherty & Chojkier.<sup>53</sup>

La radioactividad de las proteínas sensibles a la colagenasa VII y de las no sensibles sirvió para calcular el porcentaje relativo de la producción de colágeno.

### Secreción de colágeno.

La determinación de la secreción de colágeno se realizó estableciendo con los métodos descritos y por separado la cantidad de proteínas en las células y en su medio de cultivo, expresando la secreción como el porcentaje del colágeno total que se encuentra fuera de las células.

### Hidroxilación de la prolina.

La determinamos siguiendo el método dual descrito por Chojkier y col.,<sup>35</sup> el cual básicamente consiste en el marcaje del colágeno (durante su síntesis) con [<sup>3</sup>H] prolina y [<sup>14</sup>C]prolina, los cuales van en una proporción de actividad radioactiva de 4:1.

La hidroxilación supone la sustitución del tritio situado en la posición 4-trans por el radical hidroxilo, con lo cual se pierde la radioactividad de este isótopo en forma proporcional al grado de hidroxilación, mientras que la hidroxilación de la [<sup>14</sup>C]prolina no debe modificarse, ya que los átomos de carbono no son movilizados durante la hidroxilación, por lo que su actividad no debe verse modificada.

De ahí, tenemos que el cociente <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C en el colágeno refleja el grado de hidroxilación de esta proteína, siendo obtenido por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hidroxilación} = \frac{1 - \frac{{}^3\text{H}/{}^{14}\text{C en colágeno}}{{}^3\text{H}/{}^{14}\text{C inicial en medio}}}{0.69} * 100$$

## D) CUANTIFICACIÓN DE RNA<sub>m</sub> PROCOLÁGENO $\alpha_1(I)$ .

### Extracción de RNA.

Para este fin se utilizaron los métodos descritos por White y Bancroft<sup>178</sup> y Maniatis y col.,<sup>99</sup> en los cuales se realiza la recolección de la monocapa celular por raspado, lavado con PBS, lisis del sedimento por medio de un tampón con NP-40, posterior eliminación de las proteínas por medio del fenol/cloroformo y finalmente precipitación del RNA con etanol.

### Preparación de las sondas de cDNA.

Se realizó un cultivo bacteriano con el clon HB101 transformado con el plásmido pBR322 (vector del cDNA del procolágeno  $\alpha_1(I)$ ) en medio LB broth; posteriormente, las bacterias fueron recogidas por centrifugación, lisadas y se precipitó el plásmido amplificado utilizando isopropanol.

La sonda se obtuvo mediante la digestión del plásmido amplificado con la enzima de restricción Pst 1 y purificación con Gene Clean.

La sonda purificada fue marcada isotópicamente con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP con la técnica detallada por Feinber y Vogelstein.<sup>52</sup> Los nucleótidos no incorporados se eliminaron purificando la sonda marcada por cromatografía en columna de Sephadex G-50; la actividad específica fue de aproximadamente  $1.10^9$ cpm/ $\mu$ g de DNA.

Muestras de 10 $\mu$ g de RNA citoplásmico fueron desplazadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, según el método descrito por Thomas<sup>168</sup> y posteriormente transferidas durante toda la noche (por

capilaridad de SSC 20X a filtros de nylon Hybond N, siendo fijados a esta membrana por exposición durante 5 minutos a luz ultravioleta.

Para el marcado con la sonda de DNA, se realizó una prehibridación durante 2hr a 65°C, utilizando SDS al 7%, buffer fosfato 0.5M a pH de 7.0 y 50µg de espermatozoides de salmón sonicado y hervido.

Después de este procedimiento, las membranas de nylon se dejaron hibridar durante toda la noche a 65°C en una solución similar, la cual contenía 10<sup>6</sup>cpm/ml de la sonda de DNA marcada con el P<sup>32</sup>; al finalizar ese tiempo, los filtros se lavaron en tres ocasiones a temperatura ambiente, durante 10 minutos, con SSC 2X y SDS al 0.1%, y una vez mas a 60°C durante 20 minutos, con SSC 0.1X y SDS 0.1%.

Al terminar la hibridación, los filtros fueron expuestos a películas de rayos X con pantalla intensificadora a -70°C, procediendo a cuantificar la señal captada por la misma por medio de densitometría.

## **E) CLORAMFENICOL ACETÍL TRANSFERASA.**

### **Amplificación y purificación del plásmido COLCAT 1.**

El plásmido empleado pertenece a la línea pUC de 5.4Kb, y es resistente a la ampicilina. Entre las secuencias del locus "Lac Z" y las del locus "O" existe un punto "Xba I", sensible a esta enzima de restricción, que es por donde están insertas las secuencias del promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , seguidas del gen de la enzima cloramfenicol acetil transferasa.

Las bacterias transformadas con este plásmido se encontraban

conservadas en glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; fueron cultivadas inicialmente en caldo de cultivo universal y posteriormente se vertieron en un matraz de 2,000ml, el cual contenía 1,000 ml de medio de cultivo LB broth con ampicilina ( $50\mu\text{g/ml}$ ), permaneciendo en agitación a 250 ciclos por minuto durante 4hr a  $37^{\circ}\text{C}$ , hasta que la densidad óptica a 550nm se situó entre 0.4 y 0.5, frenando en ese momento el crecimiento bacteriano mediante la adición de cloramfenicol a  $85\mu\text{g/ml}$  y manteniendo el cultivo en las mismas condiciones durante 24hr mas; en ese tiempo el plásmido se multiplica dentro de las bacterias pero no lo hacen estas.

Pasado ese tiempo, se centrifugan las bacterias a 5,000rpm durante 20 minutos con una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ ; el sedimento bacteriano fue sometido a lisis alcalina (con NaOH 0.2M y SDS al 0.1%) y enzimática (con lizozima 2mg/ml), siendo expuesta durante 20 minutos a acetato sódico con pH 4.6.

Los restos bacterianos se eliminaron por centrifugación a 12,500rpm durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ ; el sobrenadante con el plásmido, el DNA bacteriano, el RNA y las proteínas bacterianas fue digerido con  $1\mu\text{g/ml}$  de RNAasa durante 1hr, tras lo cual se eliminaron las proteínas bacterianas y el RNA con fenol/cloroformo en volúmenes 1:1.

El DNA del extracto (plasmídico y cromosómico) fue precipitado con un volumen de isopropanol durante 1hr a  $-20^{\circ}\text{C}$ , recuperándose por centrifugación a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos a 12,000rpm; este precipitado fue disuelto en agua y sometido a purificación mediante ultracentrifugación en gradiente de cloruro de Cesio, añadiendo 1g de CsCl por ml de extracto, y al



estar disuelto se añadió a la mezcla 0.8ml de una solución de bromuro de etidio a 10mg/ml, siendo centrifugado a 3,000rpm durante 15 minutos a 20°C.

El sobrenadante con el DNA plasmídico se ultracentrifugó a 44,000rpm durante 48hr a 20°C; tras esto, aparecieron tres capas teñidas de bromuro de etidio: la superior correspondiente al DNA cromosómico bacteriano, la intermedia al DNA plasmídico y otra al fondo del tubo que correspondía al RNA.

El DNA plasmídico contenía bromuro de etidio y CsCl, por lo que el colorante se eliminó mediante extracciones con un volumen de alcohol isoamílico y el CsCl por diálisis a 4°C con Tris-EDTA a un pH de 8.0; el DNA así obtenido se precipitó con 1/10 de volumen de acetato sódico 3M y 2.5 volúmenes de etanol, dejándolo a -20°C durante una hora y posteriormente centrifugándolo, obteniendo el precipitado que fue disuelto en agua y determinada su concentración mediante lecturas de densidad óptica a 260nm y 280nm.

El plásmido así obtenido fue sometido a la digestión de diferentes enzimas de restricción (Hind III y Pst I) con lo que se obtuvieron varios DNA quiméricos linearizados, todos los cuales tienen en común que su extremo 3' es portador de la totalidad de las secuencias de la CAT; sin embargo, el extremo 5' es diferente de unos a otros, ya que la región promotora del colágeno tiene una longitud variable dependiendo del lugar donde haya actuado la enzima de restricción empleada.

### Transfección de los lipocitos.

Las células empleadas para la transfección se deben encontrar en fase de crecimiento activo, tras haber sido tripsinizadas y sembradas 24hr antes; en ese momento son tripsinizadas, lavadas con PBS y resuspendidas en medio completo, siendo contadas con la técnica de exclusión de azul tripán al 0.1%.

Por cada condición experimental se utilizaron  $5 \times 10^6$  células de Ito en crecimiento, con 20 $\mu$ g de DNA de esperma de salmón sonicado, y 9 $\mu$ g de plásmido COLCAT1.

La transfección se realizó mediante electroporación con el equipo CELLJECT ELECTROPORATION SYSTEMS de Eurogentec S. A.. La suspensión de células en medio completo y a 4°C, fue sometida a un doble pulso eléctrico, el primero de los cuales se realizó a 700V, con una resistencia de 282 $\Omega$  y capacitancia de 40 $\mu$ F; el segundo de ellos se realizó fijando el voltaje en 150V, a 1200 $\mu$ F de capacitancia, siendo la resistencia infinito; es importante que el tiempo de la descarga no sea menor de 1.3mseg para que la eficacia de la transfección sea óptima.

Las células procedentes de cubetas transfectadas con el mismo plásmido fueron reunidas en un único tubo y sembradas en diferentes frascos de Roux. Tras 24hr de cultivo en condiciones estándar a 37°C, se procedió a retirar el medio de cultivo y añadir medio fresco, y en el caso de los inhibidores se realizó una preincubación de estos con las células transfectadas, antes de la adición de la IL-6.

### Medición de la actividad cloramfenicol acetil transferasa (CAT assay).

Tras la incubación de 24hr el medio de cultivo fue eliminado y las células lavadas con PBS, raspadas y centrifugadas a 12,000rpm durante 20 segundos a 20°C; el precipitado celular se resuspendió en Tris-ClH 0.25M a pH 7.5 y se sonicó, liberando así la enzima CAT sintetizada.

Para medir la actividad de esa enzima, se tomaron 103.25µl del lisado celular y se combinaron con 5µl de C<sup>14</sup>-cloramfenicol, 20µl de acetil coenzima A en concentración 4mM y 21.75µl de Tris 2M a pH de 7.4; se incubó durante 2hr a 37°C para que la enzima existente acetilara al C<sup>14</sup>-cloramfenicol, extrayendo este y sus derivados acetilados con 1ml de acetato de etilo, se centrifugo a 20°C por 2 minutos a 12,000g; se tomaron 900µl del sobrenadante de acetato de etilo y se evaporaron al vacío, redisolviendo el sedimento seco de los derivados del cloramfenicol en 10µl de acetato de etilo y se aplicaron sobre una lámina de cromatografía en capa fina de silicagel.

El cromatograma se desarrolló utilizando 200ml de una mezcla de cloroformo/metanol en una proporción 190:10 a temperatura ambiente durante 2hr, secando la placa y exponiendo a una autorradiografía durante 24hr, leyendo la marca resultante por densitometría. La actividad de la cloramfenicol acetil transferasa se expresa en porcentaje de cloramfenicol total que se encuentra en forma acetilada en 5'000,000 de células.

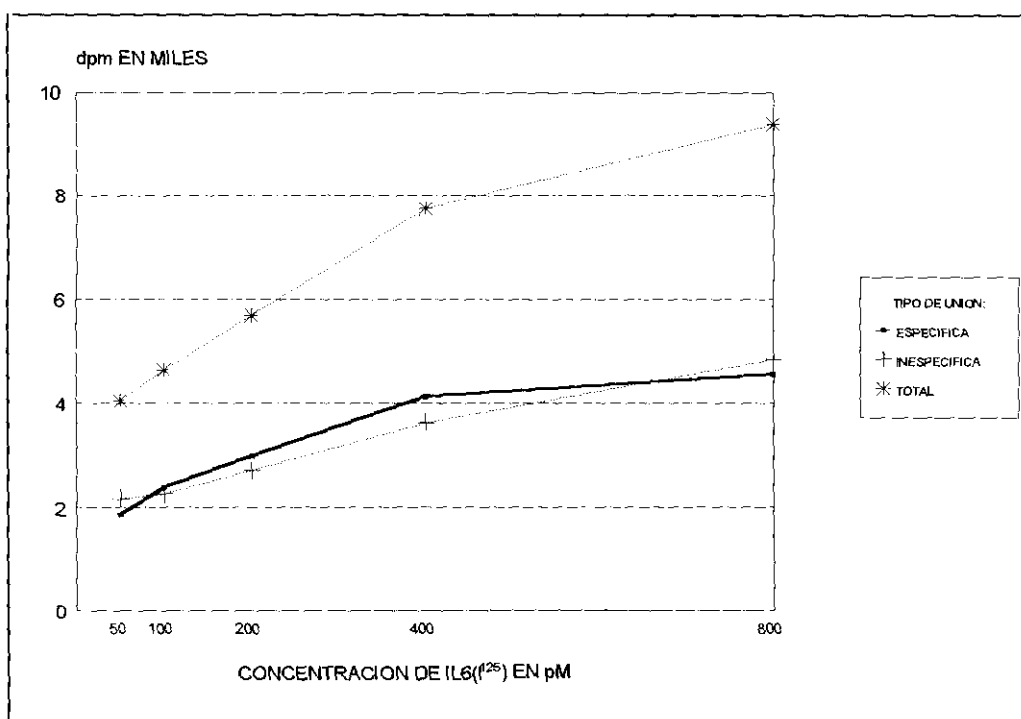
### Estadística.

Se evaluó la significancia comparando promedios y desviaciones estandar utilizando la prueba de la t de Student.

## V. RESULTADOS

### 1.- Unión de la IL-6 a sus receptores de membrana en cultivos de lipocitos hepáticos.

Cultivos de lipocitos hepáticos en confluencia, mantenidos sobre placas multipocillo de 25mm de diámetro, fueron expuestos (por triplicado) a diversas concentraciones de IL-6 recombinante humana marcada con  $I^{125}$  (50pM, 100pM, 200pM, 400pM y 800pM) y, cuando se requirió, a una concentración superior de IL-6 no marcada. Posteriormente fueron procesados para determinar la cantidad total de IL-6[ $I^{125}$ ] que se había unido a los receptores, la cantidad que se había unido en forma inespecífica y con ambos resultados, se realizó una estimación de la cantidad unida en forma específica.



**Gráfico 1. Determinación de la saturación de los receptores de membrana de la IL-6. Se utilizaron concentraciones crecientes de IL-6( $I^{125}$ ); se muestra la curva de unión total a receptores, la de unión inespecífica y la de unión específica.**

Los resultados se muestran en el Gráfico 1. Se observó que la unión específica de la IL-6 marcada con  $I^{125}$  presentó una cinética sigmoidea, con una tendencia horizontal a concentraciones de 400pM o mayores, lo que indica saturación de los receptores.

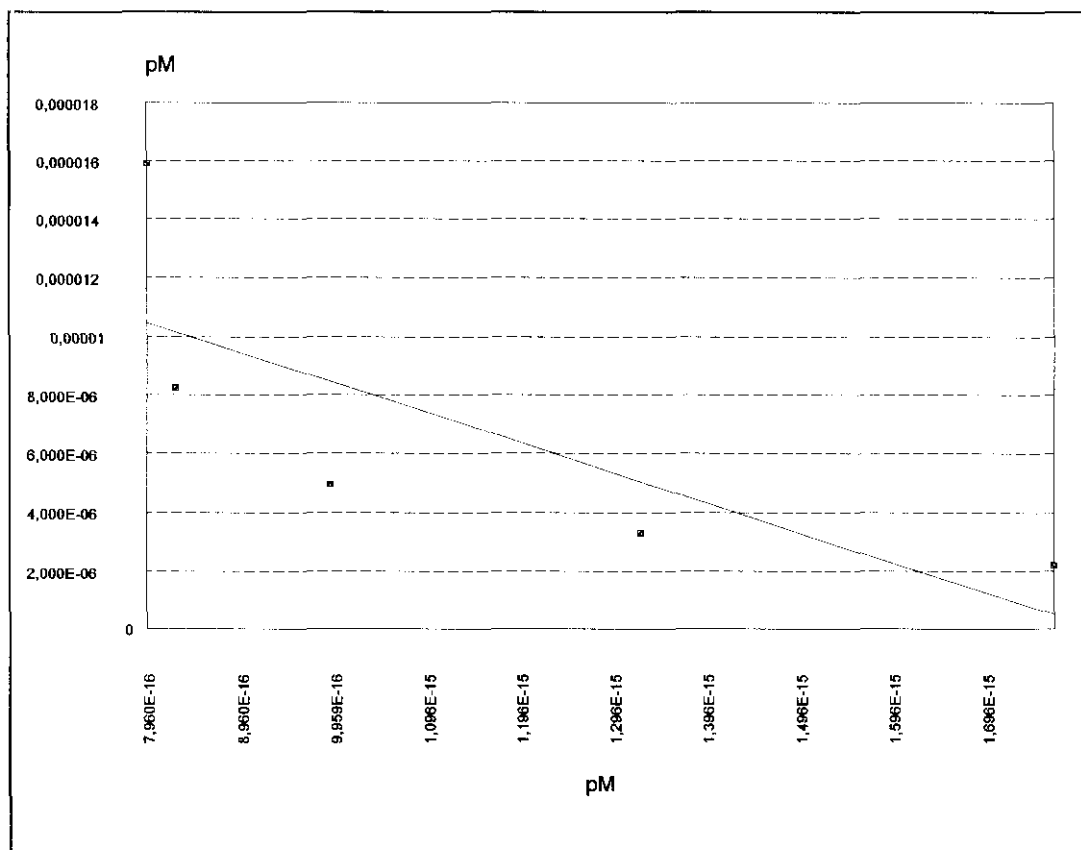


Gráfico 2. Regresión lineal de la saturación de receptores con IL-6( $I^{125}$ ).

Con los datos obtenidos en el experimento anterior (la curva de unión específica), se realizó una regresión lineal y, a partir de esta, un análisis con el método de Scatchard,<sup>109</sup> estimando que existían **766 receptores por célula**.

## 2.- Efectos proliferativos de la IL-6 en lipocitos hepáticos en cultivo.

Cultivos de lipocitos hepáticos en confluencia fueron expuestos (en dos

experimentos independientes, por triplicado) a diversas concentraciones de IL-6 (5ng/ml, 10ng/ml y 20ng/ml) junto a [6-H<sup>3</sup>]timidina; se les incubó durante 18hr, y posteriormente se midió el grado de incorporación de esta última al DNA de acuerdo con las dpm emitidas por el H<sup>3</sup> integrado en las células del cultivo, considerando esto como un índice de proliferación celular.

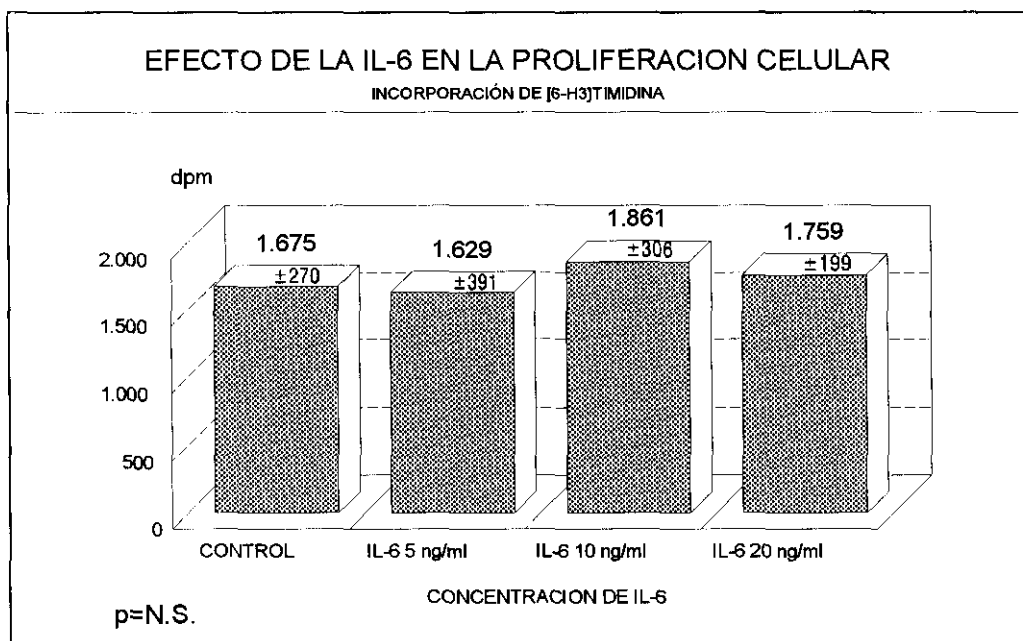


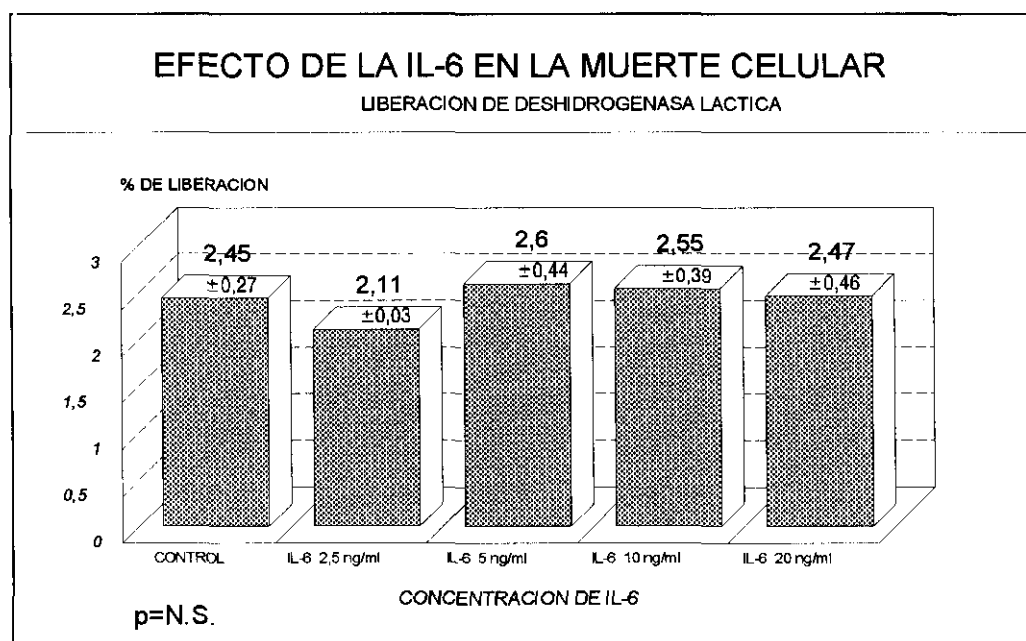
Gráfico 3. Grado de incorporación de la 6-H<sup>3</sup>timidina al DNA de las células expuestas a diversas concentraciones de IL-6 durante 18hrs .

Los resultados están representados en el Gráfico 3. Se observó que las variaciones de señal (dpm) observadas entre las distintas condiciones NO fueron significativas, lo que indica que la citoquina NO tuvo efecto estimulante sobre la proliferación en este tipo celular.

### 3.- Efectos citotóxicos de la IL-6 sobre lipocitos hepáticos en cultivo.

En cultivos de lipocitos hepáticos de 5 experimentos independientes,

expuestos a diversas concentraciones de IL-6 (2.5ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml y 20ng/ml), se midió la cantidad de Deshidrogenasa Láctica (DHL) tanto de la fracción celular como en la extracelular. A partir de esas cifras, se realizó una estimación de la tasa de liberación de la DHL, considerando los incrementos de esta como indicador de muerte celular.



**Gráfico 4. Citotoxicidad celular. IL-6 en concentraciones variables, incubación durante 18hr; la medición de la DHL (deshidrogenasa láctica) se realizó por separado en las células y el medio de cultivo, los resultados de este gráfico calculados a partir de ambas mediciones.**

Los resultados se muestran en el Gráfico 4. Se observó que NO existió incremento significativo, en ninguna condición, de la tasa de liberación de la DHL, considerando que esta citoquina NO tiene efecto citotóxico sobre este tipo celular.

#### **4.- Efecto de la IL-6 sobre el promotor del procolágeno $\alpha_1(I)$ .**

Cultivos de lipocitos hepáticos, transfectados con el gen de la

Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) unido al promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , fueron expuestos a diversas concentraciones de IL-6 (5ng/ml y 10ng/ml). Se les incubó durante 18hr y posteriormente se les procesó para medir la actividad de la enzima CAT resultante utilizando para ello un substrato de Cloranfenicol marcado con  $C^{14}$ .

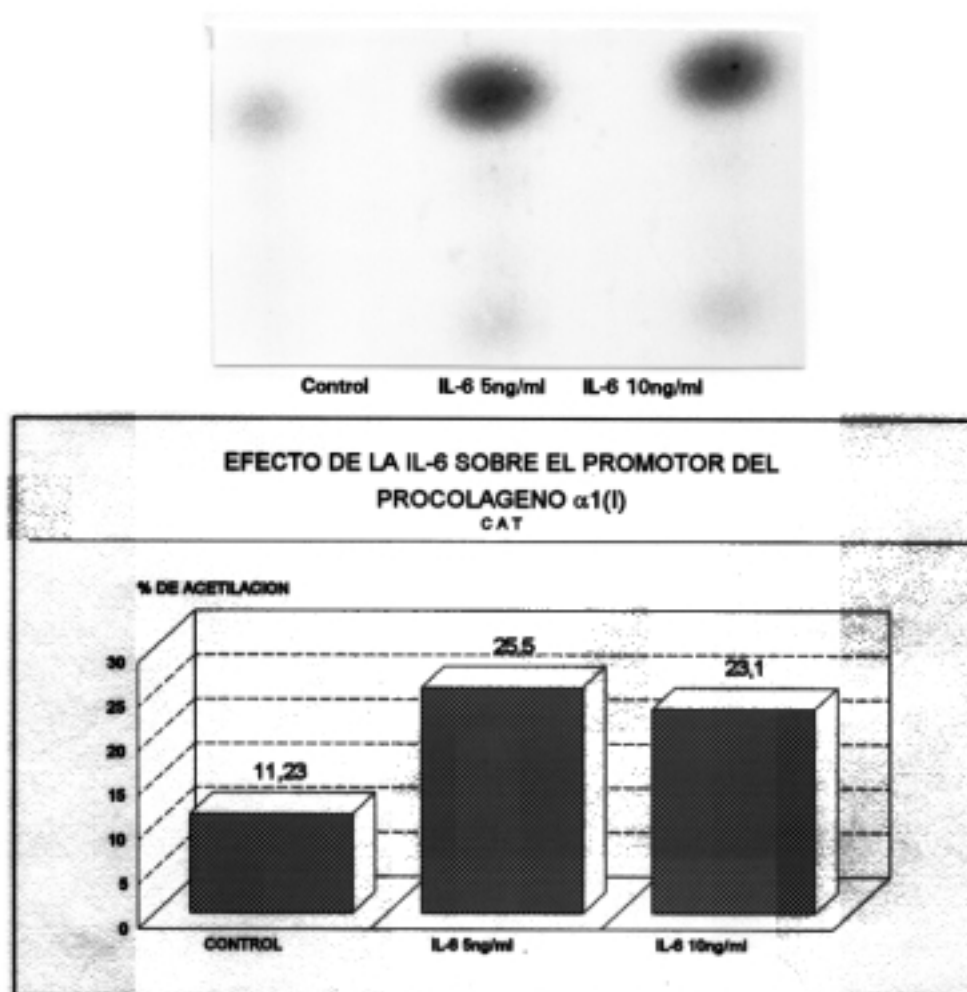


Gráfico 5. Medición de la actividad de la CAT resultante de estimular el promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$  unido al gen de la CAT, sobre un substrato de cloranfenicol- $C^{14}$ .

Los resultados se muestran en el Gráfico 5. Se observó que el grado de actividad de la enzima (resultado de la estimulación del promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$  unido al gen CAT) se incrementaba cuando los cultivos eran



expuestos a diversas concentraciones de IL-6, lo que indica que la citoquina SI ejerce efecto sobre el promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$ .

### 5.- Efecto de la IL-6 sobre el RNAm de procolágeno $\alpha_1(I)$ .

A) Cultivos de lipocitos hepáticos fueron expuestos a diferentes concentraciones de IL-6, (5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 40ng/ml y 80ng/ml de medio de cultivo), siendo incubados durante 18hr y procesados con el método del Northern blot para la medir la cantidad de RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$ .

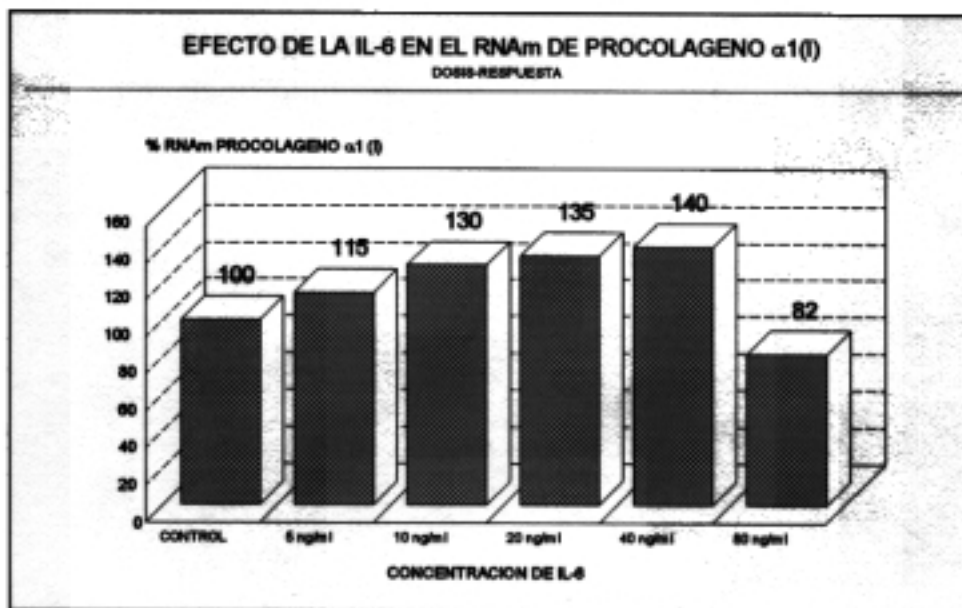
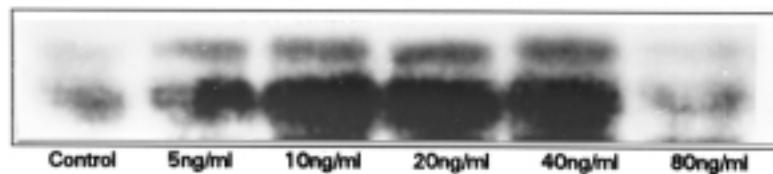


Gráfico 6. Cantidad relativa de RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . Diversas concentraciones de IL-6, incubación durante 18hr.

Los resultados se muestran en la el Gráfico 6. Los resultados están expresados en el porcentaje de expresión de RNAm con respecto a un control

(100%). Se observó que la expresión del RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$  aumentaba en relación al incremento en la concentración de la IL-6 del medio de cultivo, con respuestas máximas en concentraciones de 5 a 20ng/ml, lo que indica que la estimulación del promotor de procolágeno  $\alpha_1(I)$  se traduce en un mensaje de respuesta efectora.

B) Cultivos de lipocitos hepáticos fueron expuestos a una concentración de 10ng/ml de IL-6, con diferentes tiempos de incubación (3hr, 6hr, 9hr, 12hr y 24hr), siendo procesados por el método del Northern blot para determinar la cantidad de RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$ .

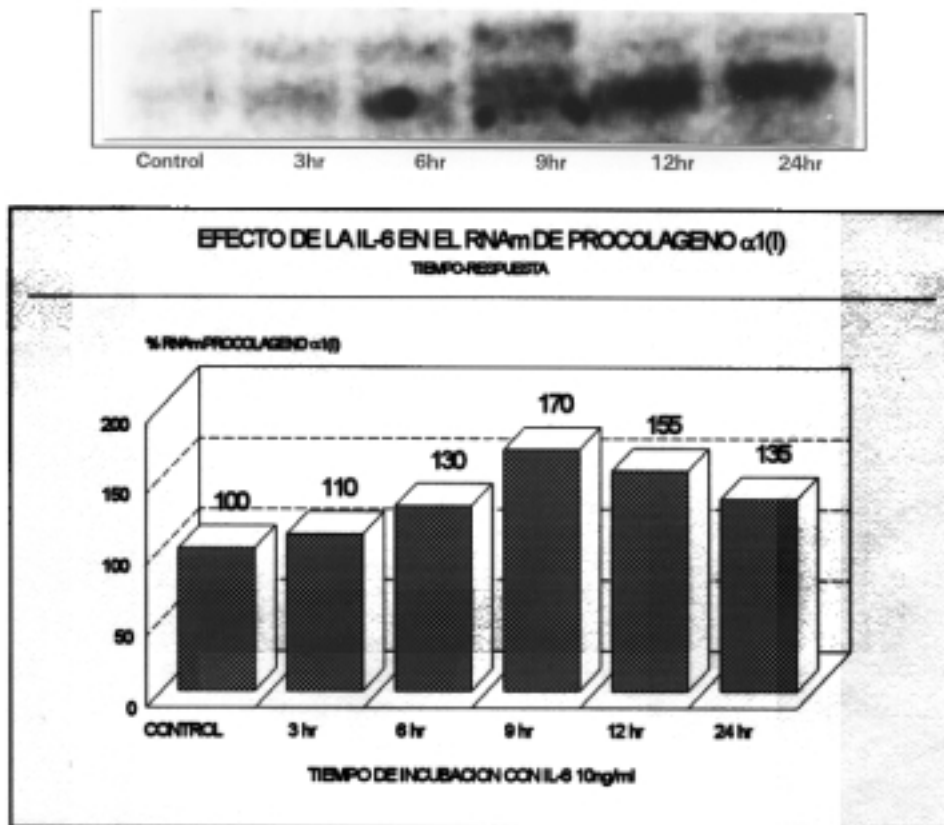


Gráfico 7. Cantidad relativa de RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . Diversos tiempos de incubación en una concentración de IL-6 de 10ng/ml.

Los resultados están representados en el Gráfico 7. Se observó que la expresión del RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$  presentaba un incremento en relación al aumento en el tiempo de incubación al que fueron sometidos, alcanzando los niveles máximos en los tiempos comprendidos entre las 9hr y 24hr.

C) Cultivos de lipocitos hepáticos fueron sometidos a la inhibición de la síntesis de proteínas, utilizando cicloheximida a una concentración de  $100\mu\text{M}$ . Posteriormente se midió la expresión del RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$  con el método del Northern blot.

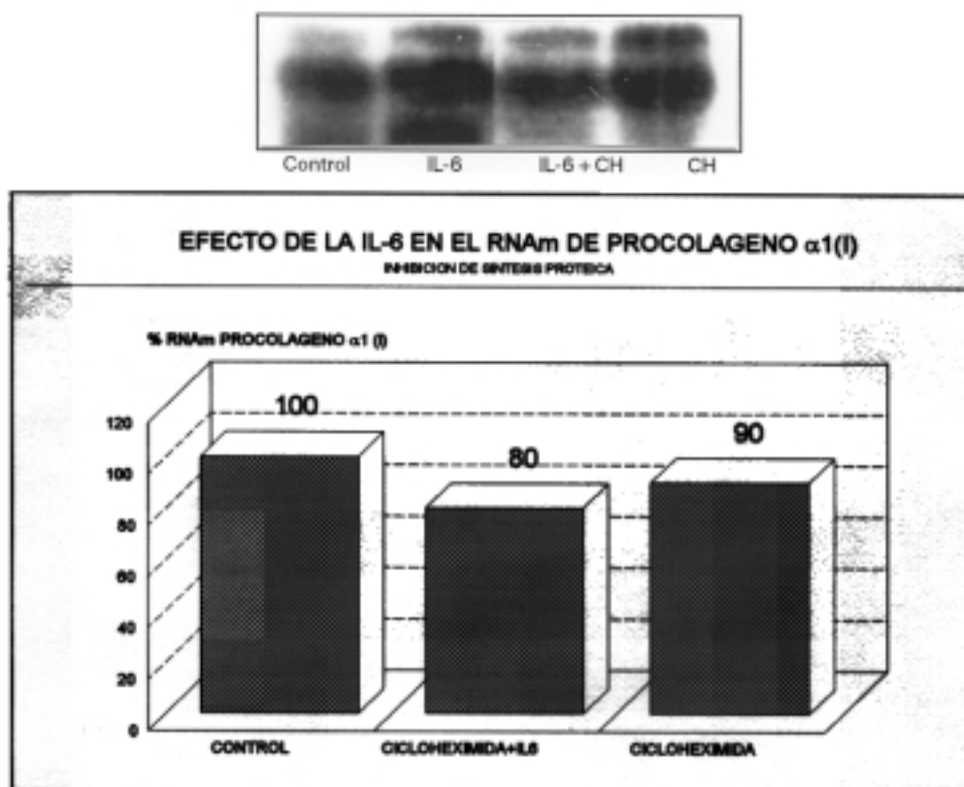


Gráfico 8. Cantidad relativa de RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$ ; cicloheximida  $100\mu\text{M}$ , preincubación 2hr; IL-6  $10\text{ng/ml}$ , incubación 18hr.

Los resultados se muestran en el Gráfico 8. Se observó que, al inhibir la síntesis proteica, se presentaba una disminución en el efecto de la IL-6 sobre

la expresión del RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$ , lo que indica que en la vía que regula el efecto de esta citoquina participa una proteína.

D) Se realizó la inhibición específica de algunas vías intracelulares de transducción de señal en cultivos de lipocitos hepáticos, evaluando en todos los casos como se afectaba la expresión del RNAm del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , utilizando para ello el método del Northern blot. Los resultados se muestran como porcentaje de RNAm en relación a su control.

En el caso de las proteínas G unidas al receptor de membrana, se evaluaron utilizando la Toxina Colérica (concentración 0.4 $\mu$ g/ml) y Toxina Pertussis (concentración 100ng/ml).

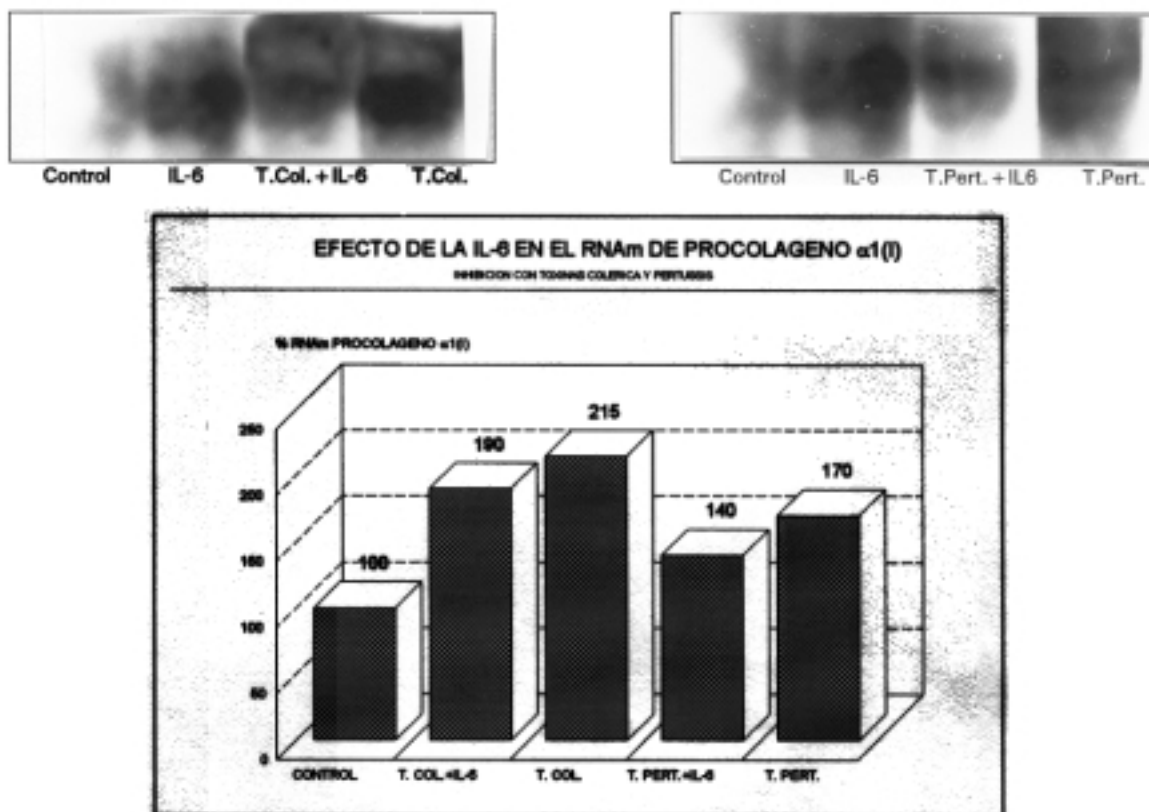


Gráfico 9. Inhibición de proteínas G. T. Col. = toxina colérica 0.4 $\mu$ M, preincubación 2hr, y T. Pert. = toxina pertussis 100ng/ml, preincubación 24hr; IL-6 10ng/ml, incubación 18hr.

Los resultados se muestran en el Gráfico 9. Se observó que, en presencia de cada una de las toxinas, el efecto de la IL-6 sobre la expresión del procolágeno  $\alpha_1(I)$  se veía inhibido, por lo que se considera que el receptor es sensible a ambas toxina, probablemente acoplado a una proteína G.

Para explorar la vía de la PLA2, se utilizó BPB (bromuro de parabromofenacilo) 20 $\mu$ M, o Quinacrina 2 $\mu$ M.

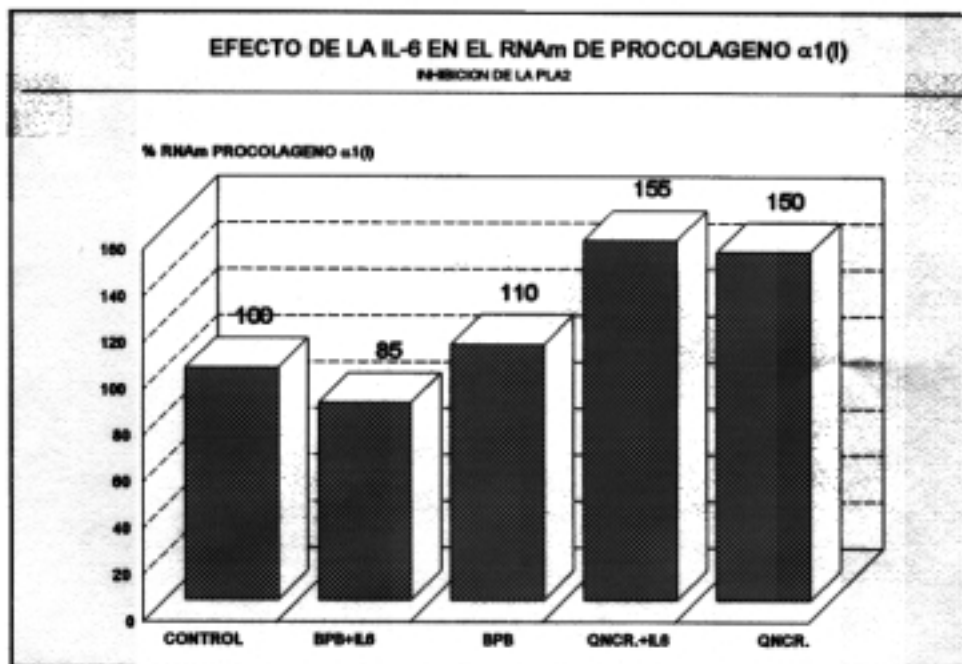


Gráfico 10. Inhibición de PLA2. BPB = bromuro de parabromofenacilo 20 $\mu$ M; Quinacrina 2 $\mu$ M; ambas con preincubación de 2hr; IL-6 10ng/ml, incubación 18hr.

Los resultados se muestran en el Gráfico 10. Se observó que al inhibir esta vía con el BPB y con Quinacrina, el efecto de la IL-6 sobre la expresión

del RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$  se anulaba, por lo que se considera que esta vía participa en la transducción del estímulo de esta citoquina.

Para inhibir la vía de la lipoxigenasa se utilizó NDGA (Ácido nordihidroguayarético) a una concentración de  $24\mu\text{M}$ .

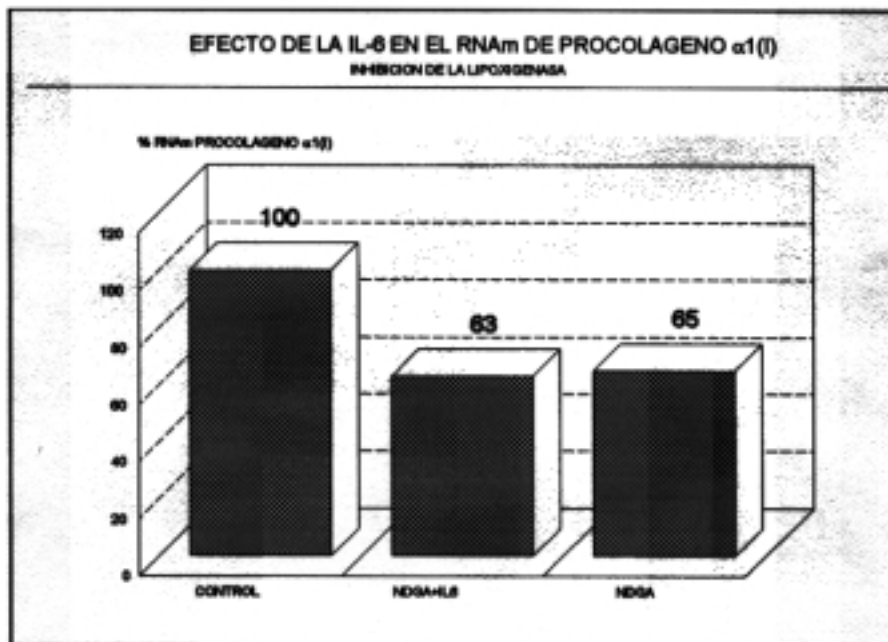
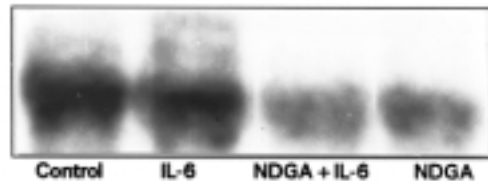


Gráfico 11. Inhibición de la vía de la Lipoxigenasa. NDGA = Ácido nordihidroguayarético  $24\mu\text{M}$ , preincubación de 2hr; IL-6 10ng/ml, incubación 18hr.

Los resultados se muestran en el Gráfico 11. Se observó que, al inhibir la vía de la lipoxigenasa, se producía una inhibición del efecto de la IL-6 sobre el RNAm del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , lo que indica que a través de esta vía se continúa la transducción del estímulo de esta citoquina, siendo por otra parte una de las dos posibilidades en la  $\text{PLA}_2$ .

La vía de la ciclooxigenasa fue inhibida utilizando Indometacina a una concentración de 100 $\mu$ M.

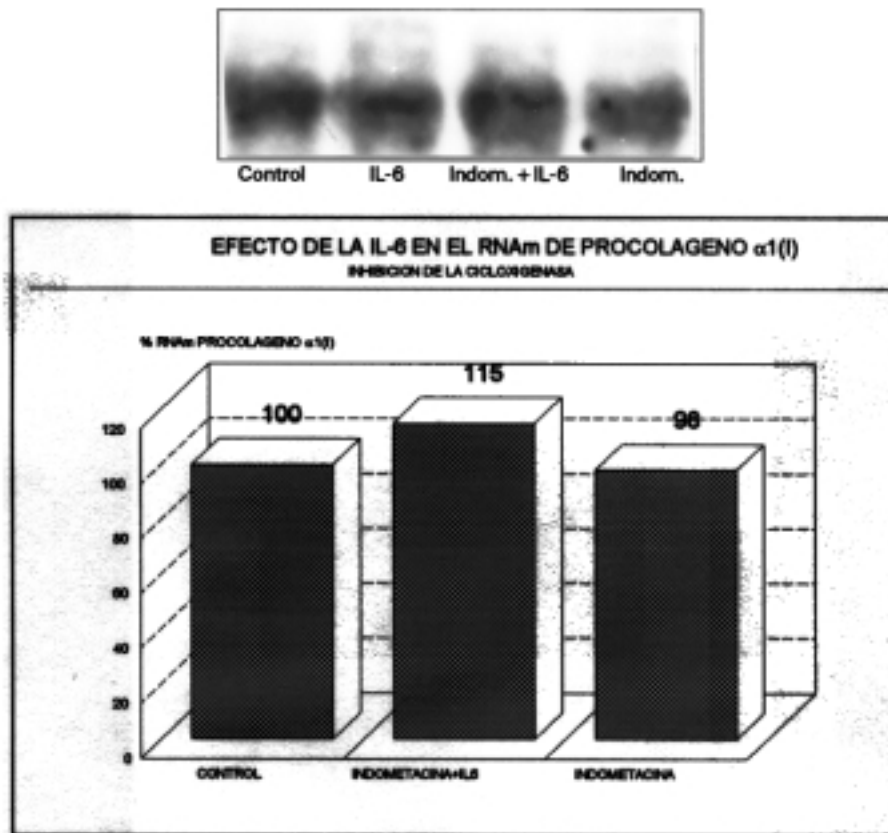
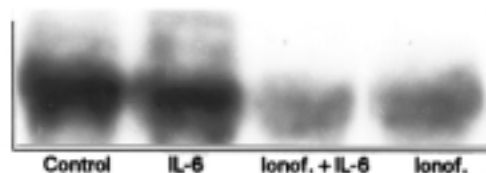


Gráfico 12. Inhibición de la vía de la ciclooxigenasa. Indometacina 100 $\mu$ M, preincubación 2hr; IL-6 10ng/ml, incubación 18hr.

Los resultados se muestran en el Gráfico 12. Se observó que, al inhibir esta vía, NO se alteró el efecto de la IL-6 sobre el promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , por lo que NO participa en la transducción de la señal de esta citoquina.

Para aumentar la presencia de calcio citosólico se utilizó Ionóforo con una concentración de 10 $\mu$ M.



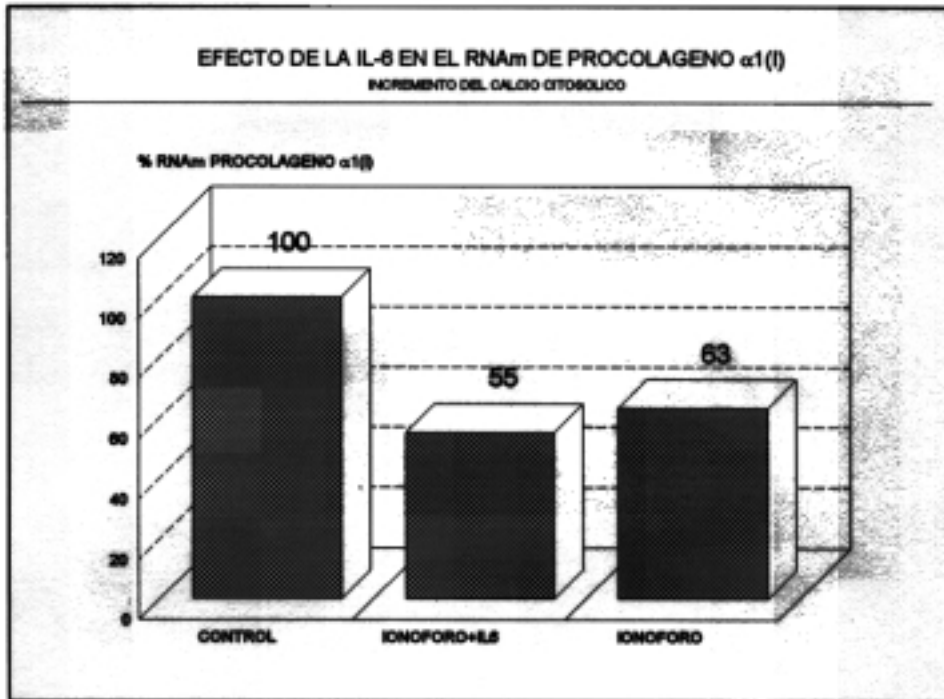
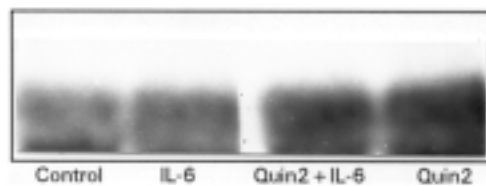


Gráfico 13. Incremento del calcio citosólico. Ionóforo 10 $\mu$ M, preincubación 2hr; IL-6 10ng/ml, incubación 18hr.

Los resultados se muestran en el Gráfico 13. Se observó que, al aumentar la presencia del calcio citosólico, el efecto de la IL-6 sobre el promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$  se anulaba, lo que indica que este ion participa en la modulación del efecto de esta citoquina.

Para evaluar el efecto de la disminución del calcio citosólico en la regulación del efecto de la IL-6, se utilizó Quin2 con una concentración de 40 $\mu$ M.





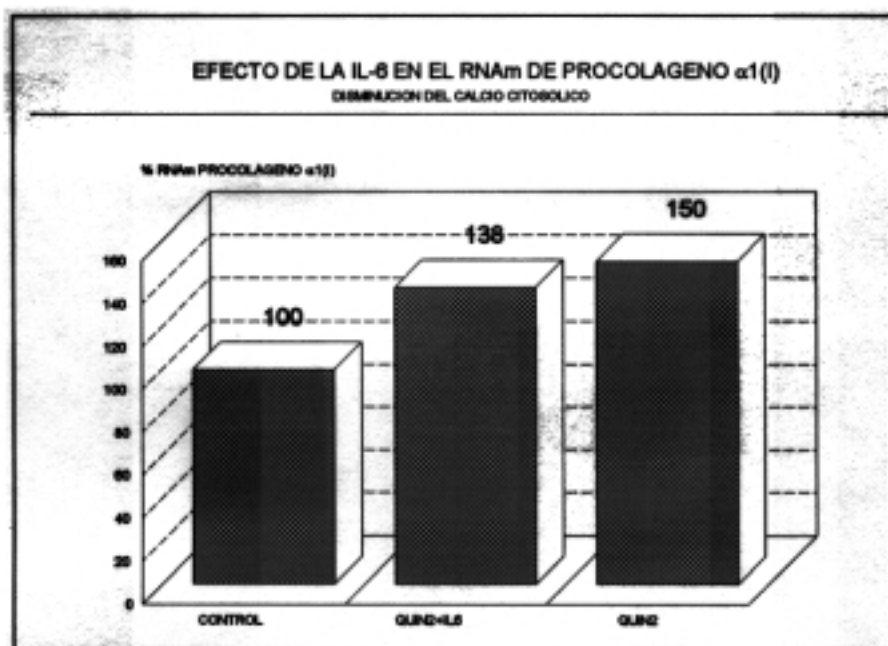
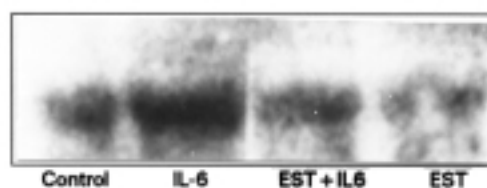


Gráfico 14. Inhibición del calcio citosólico. Quin2 40 $\mu$ M, sin preincubación; IL-6 10ng/ml, incubación 18hr.

Los resultados se muestran en el Gráfico 14. se observó que, al inhibir el calcio citosólico (esto es, disminuir su nivel citosólico por el secuestro del ion intracelular), el efecto de la IL-6 sobre el promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$  resultaba inhibido, lo que indica que la disminución de este ion participa en la transducción de la señal de esta citoquina.

Para evaluar la vía de la PKC (proteínquinasa C) se utilizaron EST. (Estaurosporina), H7 (1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina) o PMA (Acetato de miristoilforbol).



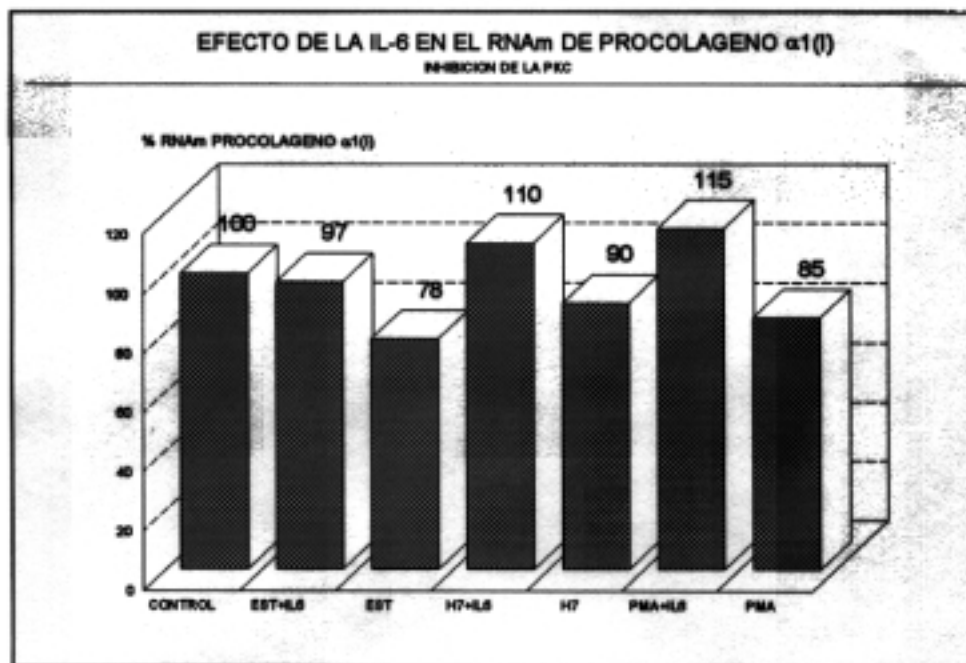
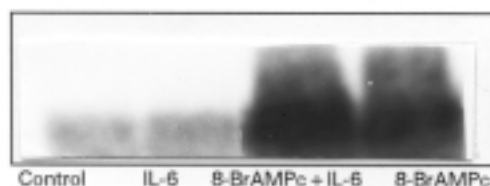


Gráfico 15. Inhibición de la PKC. EST = estaurosporina 0.5M; H7 = 1-(5-isoquinolinil-sulfonil)-2-metilpiperazina 50M; PMA = acetato de miristolforbol 100ng/ml; preincubación 2hr. IL-6 10ng/ml, incubación 18hr.

Los resultados se muestran en el Gráfico 15. Se observó que, al inhibir esta vía con cada una de las tres sustancias utilizadas, NO se alteraba el efecto de la IL-6 sobre el RNAm del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , por lo que se considera que esta vía NO participa en la transducción del estímulo de esta citoquina.

Para inhibir la vía del AMPc se utilizó 8BrAMPc (8-bromo-AMPc), Forskolina o IBMX (Iso-butil-metil-xantina).



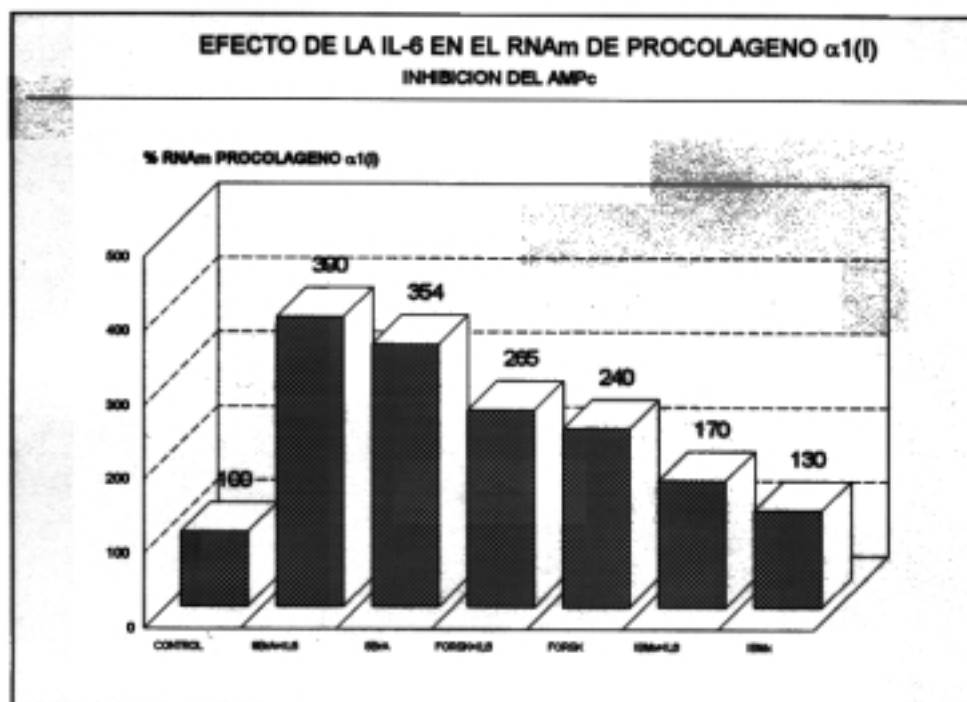


Gráfico 16. Inhibición o estimulación del AMPc. 8BrA = 8 bromo AMPc 1 $\mu$ M; Forsk = forskolina 100 $\mu$ M; IBMX = iso butil metil xantina 250 $\mu$ M; preincubación 2hr. IL-6 10ng/ml, incubación 18hr.

Los resultados se muestran en el Gráfico 16. Se observó que, al inhibir o estimular el AMPc, NO se producía alteración del efecto de la IL-6 sobre el RNAm del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , por lo que se considera que esta vía no participa en la regulación de la transducción de la señal de esta citoquina.

#### 6.- Efecto de la IL-6 sobre la producción de colágeno en lipocitos hepáticos en cultivo.

A) Para evaluar la producción de colágeno total, cultivos de lipocitos hepáticos en confluencia fueron expuestos durante 14hr a diversas

concentraciones de IL-6 (2.5ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml y 20ng/ml) en nueve experimentos independientes (por triplicado), agregándose H<sup>3</sup>-prolina y manteniéndose en incubación durante 5hr mas. Posteriormente, fueron procesados con el método de Peterkofsky y Diegelman para la determinación de proteínas colágenas y no colágenas.

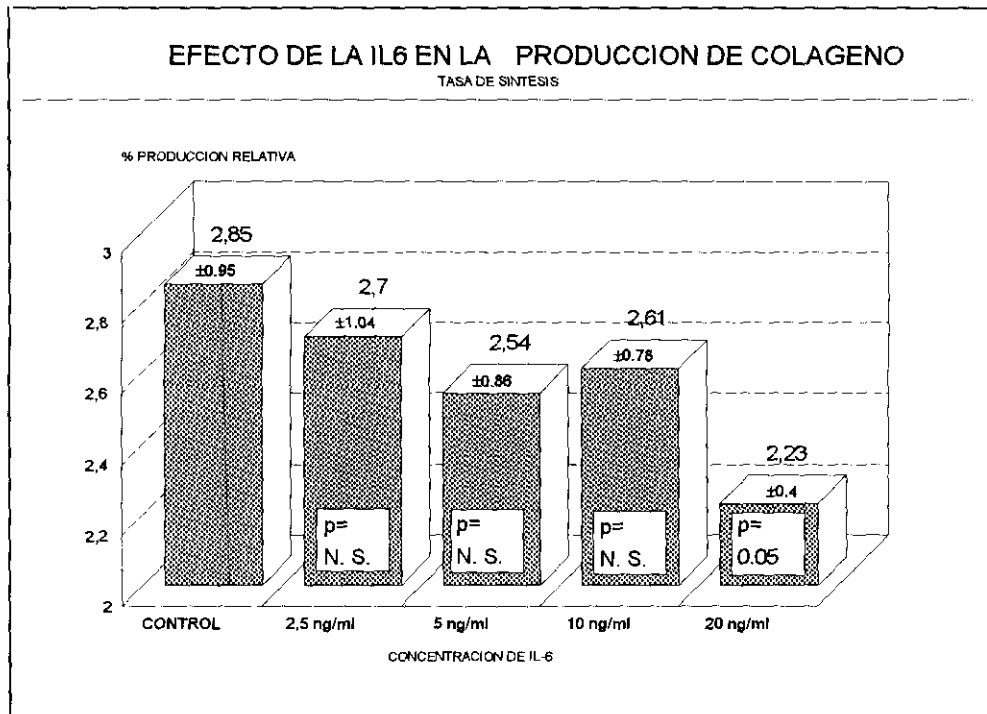


Gráfico 17. Porcentaje relativo de colágeno, determinado por la incorporación de H<sup>3</sup>-prolina; cultivos incubados con diversas concentraciones de IL-6.

Los resultados se muestran en el Gráfico 17. Se observó que no sólo NO existió un incremento de la tasa de producción de colágeno total (como se esperaba por los incrementos de RNAm de procolágeno  $\alpha 1(I)$ ), sino que se presentó una leve disminución de la misma, lo cual alcanzó niveles significativos a la concentración máxima empleada (20ng/ml).

**B)** Para discriminar las causas del hallazgo anterior, se realizó (en cuatro

ocasiones, por triplicado) la determinación de la tasa de síntesis de colágeno procesando por separado los componentes celulares de los extracelulares, utilizando para ello diversas concentraciones de IL-6 (2.5ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml y 20ng/ml) y, con los resultados de ambos, poder estimar la tasa de secreción.

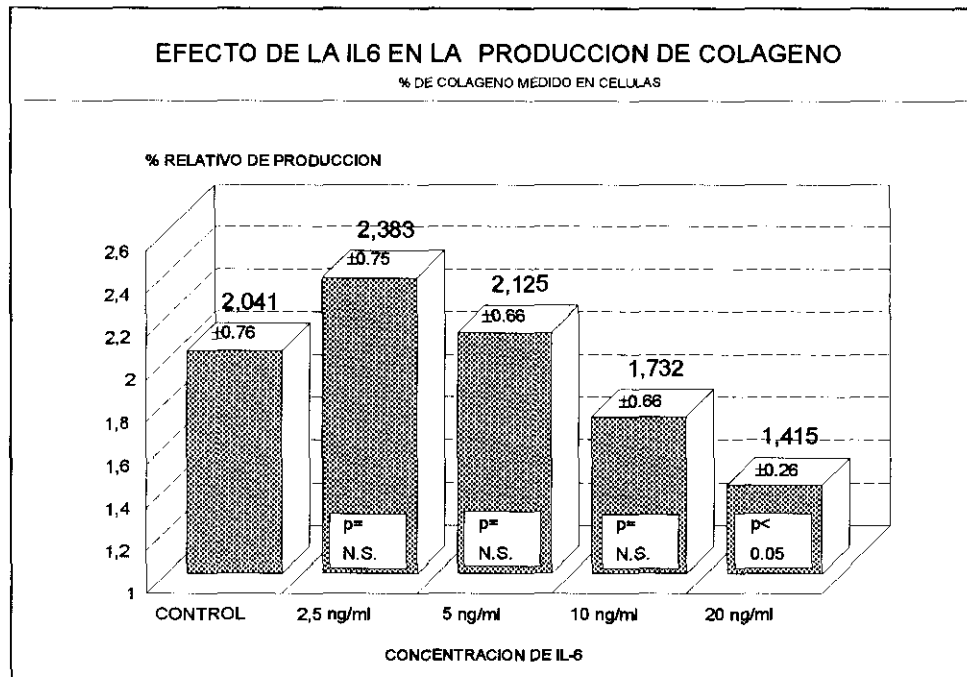


Gráfico 18. Porcentaje relativo de colágeno, determinado por la incorporación de  $H^3$ -prolina en la fracción celular de cultivos de lipocitos expuestos a diversas concentraciones de IL-6.

Los resultados de la fracción celular se muestran en el Gráfico 18. Se observó que la tasa relativa de producción de colágeno presentaba pequeñas variaciones (aumento/disminución) no significativas con respecto al control aunque, al aumentar las concentraciones de la citoquina, se observaba cierta disminución que sólo fue significativa a la concentración máxima empleada.

Los resultados de la fracción extracelular (medio de cultivo) se muestran en el Gráfico 19. Se observó que existía una disminución

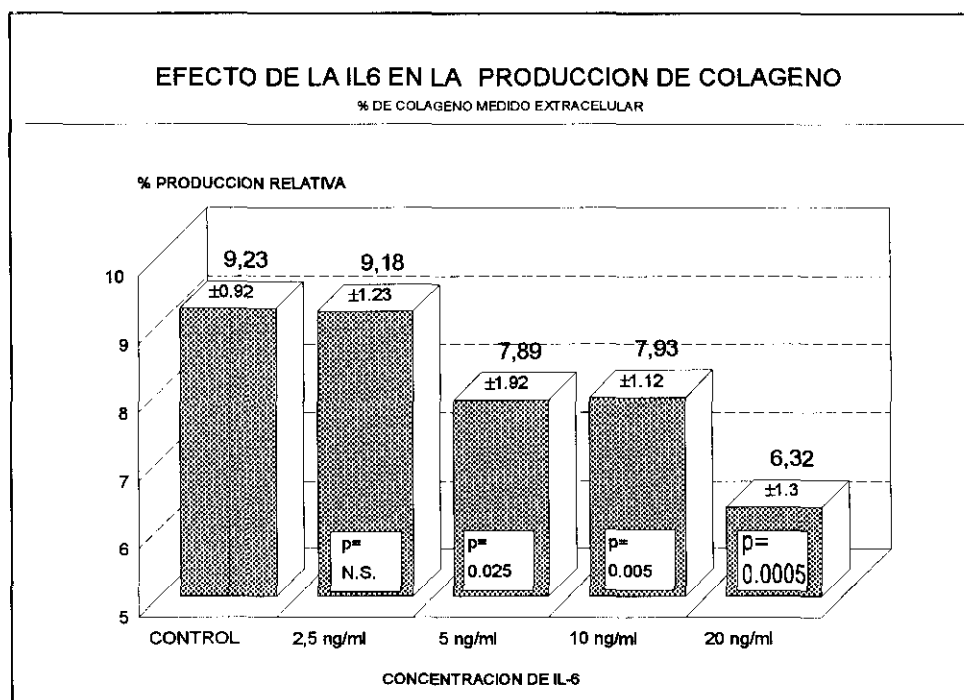


Gráfico 19. Porcentaje relativo de colágeno determinado por la incorporación de  $H^3$ -prolina; determinación en el medio de cultivo de diversas concentraciones de IL-6.

significativa en casi todas las concentraciones utilizadas de la citoquina.

Con los resultados que se habían obtenido por separado en cada condición, se realizó la estimación de la secreción del colágeno.

Los resultados se muestran en el Gráfico 20. Se observó que sólo existieron variaciones **NO** significativas en la secreción de colágeno entre las distintas concentraciones de IL-6, lo cual indica que **NO** son alteraciones en este proceso las responsables de la disminución de la tasa de producción de colágeno registrada con anterioridad.

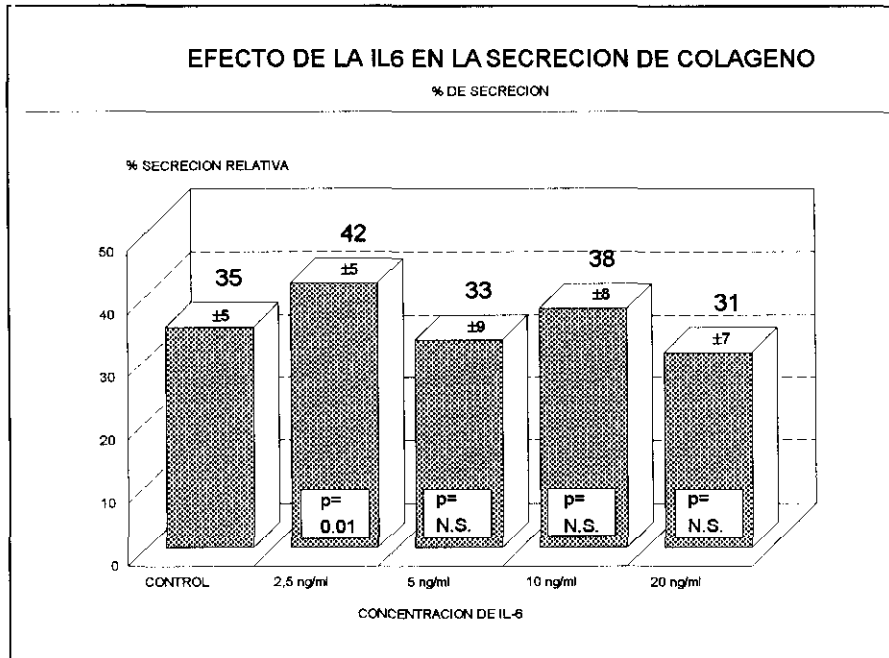


Gráfico 20. Porcentaje de secreción relativa de colágeno, con distintas concentraciones de IL-6.

C) La hidroxilación de prolina se midió en un experimento por triplicado, realizando una estimación con un marcado dual de H<sup>3</sup>-prolina C<sup>14</sup>-prolina.

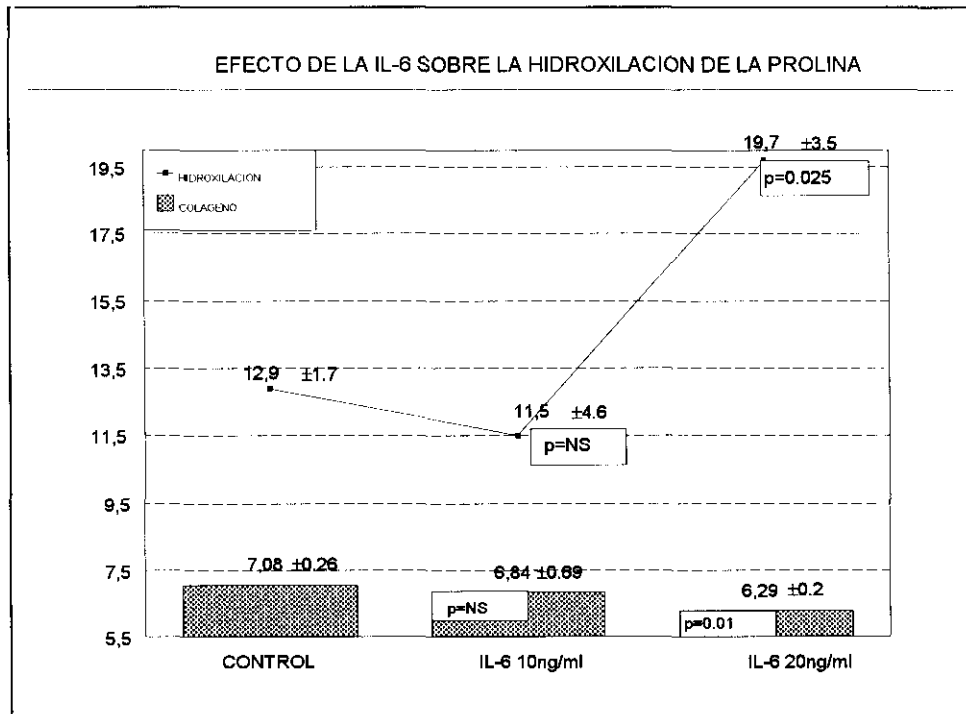


Gráfico 21. Comparación entre el porcentaje de producción relativa de colágeno (barras) y el porcentaje de hidroxilación de la prolina (líneas).

Los resultados se muestran en el Gráfico 21. Se observó que al realizar una estimación del porcentaje relativo de producción de colágeno (en base al marcado con  $H^3$ ), este presentó un comportamiento similar al que había tenido anteriormente, con una disminución significativa al utilizar una concentración de 20ng/ml de IL-6; en contraste, se observó que la hidroxilación de la prolina no sólo NO disminuyó, sino que a esta misma concentración presentó un incremento significativo, indicando que esta condición NO es responsable de la disminución de colágeno total que se detectó anteriormente, sugiriendo que probablemente es un proceso extracelular el que ocasiona el efecto paradójico de una disminución del colágeno, a pesar de que existe un estímulo que provoca una respuesta positiva en la síntesis de la proteína (la IL-6).

**D)** Se realizó una estimación indirecta de la actividad de la colagenasa

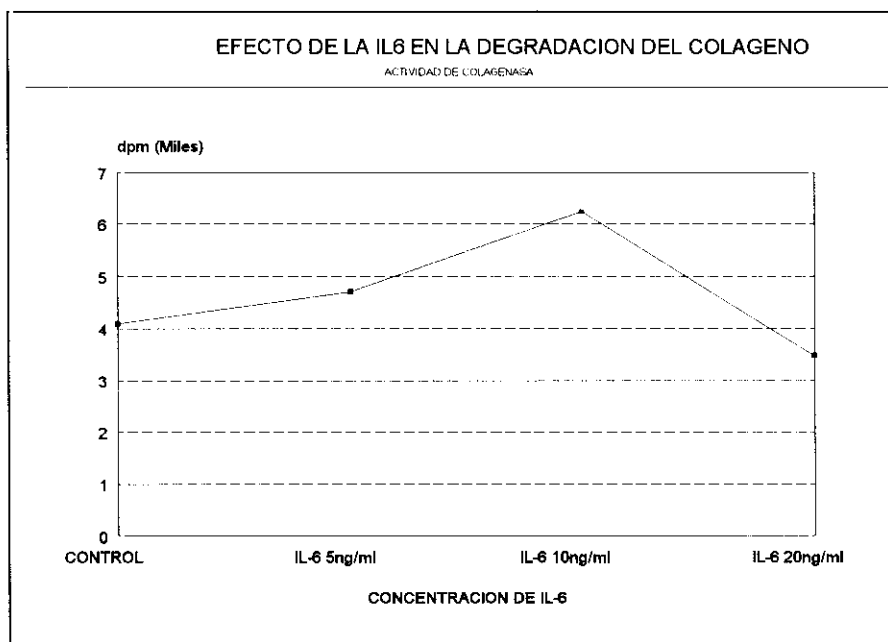


Gráfico 22. Actividad de colagenasa en medios de cultivo con diversas concentraciones de IL-6.



en los medios de cultivo, utilizando modificaciones del método de Peterkofsky y Diegelman; medimos la capacidad que tenían los medios de cultivo para digerir colágeno marcado con  $H^3$ .

Los resultados se muestran en el Gráfico 11. Se observó que existió un incremento en la capacidad de digestión de Colágeno[ $H^3$ ] de acuerdo al incremento en la concentración de IL-6 a la que habían sido expuestos los cultivos, con una disminución en la concentración máxima investigada, lo que indica que existe un aumento de la actividad de la colagenasa producido en forma simultánea a la estimulación del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , ambos producidos por la IL-6.

## VI. DISCUSIÓN

Por su relevancia como problema de salud, el estudio de la fibrosis hepática es un tema en el cual se permanece en constante búsqueda de los mas básicos procesos de su fisiopatología, con la esperanza de que, una vez conocidos, permitan intervenir durante su desarrollo y así evitar las graves consecuencias que provoca.

En la actualidad se pone el acento en los procesos que suceden a nivel molecular, ya que estos parecen ser los determinantes para que la patología siga la variada gama de evoluciones que presenta.

Con la identificación de los mensajeros celulares conocidos como factores de crecimiento y citoquinas, se ha dado un importante paso adelante en el entendimiento de muchos de los procesos que ocurren en el organismo, la fibrosis entre ellos.

Desde su descubrimiento en 1985 (Hirano<sup>75</sup>), se le han identificado múltiples efectos, entre los que Nesbitt<sup>126</sup> enumera los siguientes: inducción de las proteínas de fase aguda en el hígado, inducción de inmunoglobulinas en células B, diferenciación de células neurales, activación de células hematopoyéticas, inducción de la secreción del Factor de Crecimiento Nervioso por los astrocitos, y participación como un factor de crecimiento en las células T, hibridomas de células B y plasmocitomas.

Los estudios sobre el papel que tiene la IL-6 en la fibrogénesis, y sobre los lipocitos hepáticos son limitados.

A pesar de que participa en la diferenciación de varias líneas celulares, nosotros no encontramos que la IL-6 presentara efecto proliferativo ni citotóxico en los cultivos de lipocitos.

De acuerdo a nuestros resultados, encontramos que en los lipocitos hepáticos de la línea celular 2G existen aproximadamente 760 receptores por célula; esto va de acuerdo a lo escrito por Yamasaki<sup>180</sup> y Kishimoto,<sup>90</sup> quienes han mencionado que el número habitual de receptores de las citoquinas varía generalmente entre 100 y 1,000 por célula. Un número bajo de receptores habla de un eficiente sistema de amplificación del estímulo para lograr realizar su efecto final. La secuencia del DNA para el receptor de IL-6 fue establecida por Yamasaki.<sup>180</sup>

Según lo escrito por Taga,<sup>166</sup> y posteriormente apoyado por algunos autores (entre ellos Cheng-Kiang<sup>32</sup>), el receptor de la IL-6 está compuesto de la asociación de dos glicoproteínas, gp80 y gp130; la primera de ellas (gp80) es el sitio de unión de la citoquina, mientras que la segunda (gp130) tiene un fragmento intracitoplasmático sin dominios para la tirosinquinasa, a pesar de lo cual participa en la transducción de la señal por mecanismos no del todo claros (Kishimoto,<sup>91</sup> Schooltink,<sup>158</sup> Narazaki<sup>121</sup>)

Además, se ha considerado que son precisamente la existencia de diferencias en esta región las responsables de que existan efectos tan diversos entre los distintos tipos celulares sobre los que actúa la IL-6 (Hibi<sup>74</sup>).

Aunque ya había sido demostrado previamente el aumento de la expresión del RNAm del procolágeno  $\alpha_1(I)$  en respuesta a la IL-6 (Greenwel<sup>62</sup>),

nuestros resultados demuestran en forma clara que este efecto se debe a un estímulo sobre el promotor del procolágeno  $\alpha(I)$ ; además, encontramos la dependencia que tiene este efecto sobre la concentración de la citoquina, así como su tiempo de exposición a la misma; esto nos indica los parámetros en los cuales se produce una saturación de los sistemas que participan en la transducción de la IL-6.

La IL-6, al igual que otras citoquinas, ejerce su efecto después de haberse unido a receptores específicos de membrana, los cuales generan señales que modifican la expresión del gen del procolágeno  $\alpha_1(I)$ .

Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos de señalización intracitoplasmáticos que participan en este proceso. En este sentido, nuestros resultados indican la participación de la vía de la PLA<sub>2</sub> y Lipoxigenasas, con participación del Calcio citosólico. En este sentido, se ha documentado que en otras líneas celulares en las que la IL-6 actúa, participa la vía de la PLA<sub>2</sub>; así, Yamashita<sup>181</sup> describe que en células de cáncer gástrico invasivo estimuladas con IL-6, la PLA<sub>2</sub> se encontraba aumentada. Aun así, es poca la información que en este sentido se tiene dentro del papel de la IL-6 en la fibrogénesis.

En general, las modificaciones inducidas por las citoquinas en la expresión genética están mediadas por terceros mensajeros, los cuales suelen corresponder a factores nucleares transactivadores, en otras ocasiones se trata de proteínas ya existentes en las células que son activadas, proteínas de nueva síntesis, o en último caso la anulación de otras. En cualquier caso, estos factores transactivadores se fijan a secuencias específicas cis-

activadoras del DNA y modifican su expresión genética.

En el caso de la IL-6, esta es un área en la que se han realizado múltiples estudios, habiendo identificado algunos de estos factores nucleares que son inducidos; entre ellos, se describen el NF-IL6, Oct (octamer binding protein), pRB y el AP-1 (LAP); se desconoce si el gen del colágeno posee elementos cis-activadores para el NF-IL6, pero si los hay para el AP-1 (Liska,<sup>97</sup> Houglum,<sup>77</sup> Hsu,<sup>78</sup> Chen-Kiang<sup>32</sup>); sobre este punto, se destaca que algunos de estos factores corresponden a proteínas, las cuales serían necesarias para que la IL-6 generase su efecto; en nuestro estudio, demostramos que, al inhibir la síntesis proteica, se inhibe la acción de la IL-6 sobre el promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , lo que indicaba que una proteína participaba en la vía de transducción, considerando como probable que se trate de este nivel.

Aunque es bien sabido que la síntesis proteica esta determinada por la cantidad de RNAm específico presente, intervienen también factores que no son sólo transcripcionales, sino traduccionales y postraduccionales (secreción y grado de hidroxilación en este caso).

Además, parte del colágeno puede ser posteriormente degradada como consecuencia de la acción de la colagenasa de forma que la cuantía del colágeno producido por las células puede quedar reducido de forma significativa, a pesar de que la transcripción genética esté aumentada.

En condiciones normales, la tasa de degradación puede suponer el 30% del colágeno recién sintetizado, pero en ciertas condiciones se puede incrementar hasta el 60% (Hernández<sup>73</sup>).

Un paso crítico en la formación del colágeno es la hidroxilación de las cadenas pro- $\alpha$ , que le permite adquirir su conformación estructural característica, en la cual se basan algunas de las propiedades del colágeno (Prockop<sup>140</sup>). Como se ha comentado anteriormente, nosotros hemos demostrado que a pesar de haber encontrado un efecto transcripcional sobre el promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , este no se reflejaba en el correspondiente incremento de la síntesis proteica, sin que esto se deba a alteraciones ni en la traducción del estímulo ni postraduccionales, sino al efecto producido por el aumento de la actividad de la colagenasa.

Se han descrito múltiples ensayos en los cuales la actividad de la colagenasa está aumentada en relación con la IL-6; así, Pluznik<sup>139</sup> indica que como parte del efecto de la IL-6 en la diferenciación de mielomonocitos hacia macrófagos, se incluye un aumento de la capacidad quimotáctica de estas células, el cual se ve complementado con un incremento en las cantidades de colagenasa IV que le confiere la capacidad para atravesar tejidos.

Wlaschek<sup>179</sup> ha documentado que la IL-6 es capaz de estimular la producción de colagenasa en fibroblastos dérmicos. Ishimi<sup>83</sup> encontró que en osteoblastos de ratón la síntesis de colágeno disminuía en forma inversamente proporcional al incremento de la concentración de IL-6.

Específicamente en los lipocitos Arthur<sup>7</sup> encontró que, en cultivo primario, expresan el gen de la colagenasa/gelatinasa tipo IV de 72kDa secretando la enzima tanto en forma latente como activa, con capacidad de degradación del colágeno de las membranas basales, lo que puede tener un

papel en la lesión hepática humana y en la fibrosis.

En general se acepta que la matriz subendotelial en la enfermedad o lesión hepática crónica, puede ser degradada por la actividad de la colagenasa tipo IV (Friedman<sup>56</sup>)

Por contrapartida, Iredale<sup>80</sup> ha documentado que los lipocitos tienen capacidad de sintetizar el llamado inhibidor tisular de las metaloproteinasas tipo 1, el cual es capaz de inactivar (o al menos modular la acción) a las colagenasas; lo que es mas, se ha encontrado que células sinoviales y endoteliales esta capacidad de sintetizar este inhibidor está mediada por la IL-6 (Shingu<sup>160</sup>), al igual que acontece en hepatocitos (Roeb<sup>150</sup>).

Esto muestra que, finalmente, el efecto de la acumulación del colágeno es un complejo mecanismo, con estimulantes e inhibidores que actúan en una estrecha y compleja trama que debe permanecer equilibrada; los depósitos de matriz extracelular se pueden deber a un incremento en la síntesis, disminución de la degradación o ambos pero, en el fondo, a una pérdida de este equilibrio .

## VII. CONCLUSIONES

De lo anteriormente expuesto, se realizan las siguientes conclusiones:

- La IL-6 no tiene efectos proliferativos ni citotóxicos sobre los cultivos de lipocitos hepáticos.
- Los lipocitos hepáticos en cultivo presentan 760 receptores por célula, los cuales se saturan a una concentración 400pM de la IL-6.
- La IL-6 tiene efecto en el promotor y en los niveles de RNAm del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , guardando relación con la concentración y con el tiempo de incubación utilizados.
- En la transducción de la señal que genera el estímulo por IL-6 participa una proteína G de membrana, y una proteína intracelular.
- Esa transducción se lleva a cabo a través de la vía de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)-Lipoxigenasa, siendo influida por los niveles intracelulares de Calcio citosólico.
- El incremento del RNAm del procolágeno  $\alpha_1(I)$  debido a la estimulación de los lipocitos con IL-6, no se refleja en un incremento del



porcentaje relativo de colágeno en los cultivos. Este efecto está dado por un aumento en la actividad extracelular de la colagenasa, lo cual es consecuencia de la propia estimulación de la citoquina.

## VIII. RESUMEN.

### **1.- Introducción.**

La cirrosis hepática es una enfermedad crónica del hígado, la cual ocasiona graves complicaciones que ponen en peligro la vida de los individuos que la padecen.

Aunque no son sinónimos, la cirrosis hepática es representativa de la fibrosis hepática; esta consiste en la sustitución del tejido normal hepático por depósitos de matriz extracelular, principalmente colágeno, lo cual ocasiona disfunción del órgano.

En el estudio de estos procesos se ha encontrado que, durante su patogénesis, participan diversos factores de comunicación celular como son las citoquinas inflamatorias ( $TNF\alpha$ ,  $TGF\beta$ , IL-6).

### **2.- Objetivos.**

Los objetivos del presente trabajo fueron conocer el efecto de la Interleuquina 6 (IL-6) sobre la fibrogénesis en lipocitos en cultivo, tanto en sus aspectos de síntesis de colágeno, como de los mediadores intracelulares que participan en la transducción de este estímulo.

### **3.- Material y métodos.**

Para realizar este estudio, se emplearon lipocitos hepáticos (células de Ito) de la línea celular 2G (Greenwel y col. *Lab Invest* 1989;65:644-53), mantenidos en confluencia en las condiciones adecuadas. Se realizaron mediciones de saturación y cuantificación de receptores de membrana celular

para IL-6 marcada con  $I^{125}$ ; clasificación de los receptores de acuerdo a su sensibilidad a las toxinas colérica y pertussis por inhibición de la expresión de RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$ ; estimaciones de proliferación celular por la incorporación de timidina- $H^3$ , y muerte celular por la tasa de liberación de Deshidrogenasa Láctica (DHL); estudio del efecto de la IL-6 sobre el promotor de procolágeno  $\alpha_1(I)$  con el método de la Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT); cuantificación de la expresión del gen del procolágeno  $\alpha_1(I)$  por la medición del RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$  utilizando el método del Northern blot, con estimación de las variaciones de acuerdo a la concentración utilizada, al tiempo de exposición y, con la utilización de inhibidores específicos, estudio de la participación de las diversas vías intracelulares de transducción del estímulo; cuantificación de la tasa de síntesis y secreción de colágeno con el método de Peterkofsky y Diegelmann; con modificaciones al mismo método, se registró indirectamente la tasa de actividad de la colagenasa.

#### **4.- Resultados.**

**A)** Primeramente se encontró que la incorporación de ( $H^3$ )-timidina al DNA no presentó alteraciones por el uso de diversas concentraciones de IL-6 (Control =  $1,675 \pm 270$ dpm; IL-6 a 5ng/ml =  $1,629 \pm 391$ dpm, p=NS; IL-6 a 10ng/ml =  $1,861 \pm 306$ dpm, p=NS; IL-6 a 20ng/ml =  $1,759 \pm 199$ dpm, p=NS), por lo que NO existió un efecto proliferativo de la citoquina.

**B)** La tasa de liberación de la DHL (deshidrogenasa láctica) no presentó alteraciones con diversas concentraciones de IL-6 (Control =  $2.45 \pm 0.27\%$ ;

IL-6 a 2.5ng/ml =  $2.11 \pm 0.03\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 a 5ng/ml =  $2.6 \pm 0.44\%$ ,  $p = \text{NS}$ ;  
IL-6 a 10ng/ml =  $2.55 \pm 0.39\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 a 20ng/ml =  $2.47 \pm 0.46\%$ ,  $p = \text{NS}$ )  
por lo que NO existió un efecto citotóxico de la citoquina.

**C)** Se encontró que la IL-6 presentaba una saturación de sus receptores de membrana celular a una concentración aproximada de 400pM, haciendo una estimación de 766 receptores de membrana.

**D)** Al realizar el ensayo de la CAT, se encontró que la IL-6 estimula el promotor del procolágeno  $\alpha_1(\text{I})$  (acetilación: Control = 11.23%, IL-6 5ng/ml = 25.5%, IL-6 10ng/ml = 23.1%).

**E)** Este efecto se reflejaba en un incremento de los niveles de RNAm del procolágeno  $\alpha_1(\text{I})$ , el cual aumentaba en relación con la concentración utilizada (Control = 100%, IL-6 5ng/ml = 115%, IL-6 10ng/ml = 130%, IL-6 20ng/ml = 135%, IL-6 40ng/ml = 140%, IL-6 80ng/ml = 82%), así como también con relación al tiempo de exposición a la citoquina (Control = 100%, 3hr = 110%, 6hr = 130%, 9hr = 170%, 12hr = 155%, 24hr = 135%).

**F)** Al realizar la inhibición de las proteínas G utilizando las toxinas colérica y pertussis, se encontró que el receptor resultaba inhibido por ambas (Control = 100%, T. colérica 0.4 $\mu\text{g/ml}$  + IL6 5ng/ml = 190%, T. colérica 0.4 $\mu\text{g/ml}$  = 215%; T. pertussis 100ng/ml + IL-6 5ng/ml = 140%, T. Pertussis 100ng/ml = 170%).

**G)** Al inhibir la síntesis proteica, se encontró que el efecto de la citoquina era inhibido (Control = 100%, CicloHeximida 100 $\mu\text{M}$  + IL-6 10ng/ml = 80%, CicloHeximida 100 $\mu\text{M}$  = 90%).

H) Al investigar diversas vías de transducción de señal con el mismo método, se encontró que al inhibir la vía de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) se bloqueaba el efecto de la IL-6 (Control = 100%, BPB 20μM + IL-6 5ng/ml = 85%, BPB 20μM = 110%; Quinacrina 2μM + IL-6 5ng/ml = 155%, Quinacrina 2μM = 150%); al inhibir la vía de la lipoxigenasa, también se impedía el efecto de la citoquina (Control = 100%, NDGA 24μM + IL-6 5ng/ml = 63%, NDGA 24μM = 65%), mientras que al inhibir la vía de la cicloxigenasa, este efecto NO se observaba (Control = 100%, Indometacina 100μM + IL-6 5ng/ml = 115%, Indometacina 100μM = 98%). Al explorar el efecto del calcio citosólico en la transducción del estímulo de la IL-6, se encontró que al movilizar sus depósitos celulares se producía una disminución de la expresión del RNAm (Control = 100%, Ionóforo 10μM + IL-6 5ng/ml = 55%, Ionóforo 10μM = 63%), efecto que también se presentó al disminuir los niveles celulares del mismo ion (Control = 100%, Quin2 40μM + IL-6 5ng/ml = 138%, Quin2 40μM = 150%). Al explorar otras vías, se encontró que ni la vía de la ProteinKinasa C (Control = 100%, Estaurosporina 0.5μM + IL-6 5ng/ml = 97%, Estaurosporina 0.5μM = 78%; H7 50μM + IL-6 5ng/ml = 110%, H7 50μM = 90%; PMA 100ng/ml + IL-6 5ng/ml = 115%, PMA 100ng/ml = 85%), ni la del AMPc (Control = 100%, 8BrAMPc 1μM + IL-6 5ng/ml = 390%, 8BrAMPc 1μM = 354%; Forskolina 100μM + IL-6 5ng/ml = 265%, Forskolina 100μM = 240%; IBMX 250μM + IL-6 5ng/ml = 170%, IBMX μM = 130%) aparentaban afectar la transducción.

I) A pesar de haber documentado un incremento en la expresión del RNAm del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , se encontró que ese efecto NO estaba reflejado con un aumento en la tasa de síntesis de colágeno, ya que esta no sólo NO se modificaba, sino que existía una disminución (Control =  $2.85 \pm 0.95\%$ ; IL-6 2.5ng/ml =  $2.7 \pm 1.04\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 5ng/ml =  $2.54 \pm 0.86\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 10ng/ml =  $2.61 \pm 0.78\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 20ng/ml =  $2.23 \pm 0.4\%$ ,  $p < 0.05$ ).

J) Investigando el motivo de este hallazgo, se encontró que los niveles celulares de colágeno NO presentaban disminuciones significativas en respuesta a la concentración de la IL-6, excepto a la concentración máxima empleada (Control =  $2.041 \pm 0.76\%$ ; IL-6 2.5ng/ml =  $2.383 \pm 0.75\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 5ng/ml =  $2.125 \pm 0.66\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 10ng/ml =  $1.732 \pm 0.66\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 20ng/ml =  $1.415 \pm 0.26\%$ ,  $p < 0.05$ ); sin embargo, al medir el colágeno extracelular se encontró que este disminuía en forma progresiva y significativa (Control =  $9.23 \pm 0.92\%$ ; IL-6 2.5ng/ml =  $9.18 \pm 1.23\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 5ng/ml =  $7.89 \pm 1.92\%$ ,  $p = 0.025$ ; IL-6 10ng/ml =  $7.93 \pm 1.12\%$ ,  $p = 0.005$ ; IL-6 20ng/ml =  $6.32 \pm 1.3\%$ ,  $p = 0.0005$ ); al estimar la tasa de secreción del colágeno, se encontró que esta no presentaba alteraciones significativas (Control =  $35 \pm 5\%$ ; IL-6 2.5ng/ml =  $42 \pm 5\%$ ,  $p = 0.01$ ; IL-6 5ng/ml =  $33 \pm 9\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 10ng/ml =  $38 \pm 8\%$ ,  $p = \text{NS}$ ; IL-6 20ng/ml =  $31 \pm 7\%$ ,  $p = \text{NS}$ ), por lo que este evento NO parece influir el efecto observado.

K) Al hacer una estimación del porcentaje de hidroxilación de la prolina, se encontró que esta NO disminuía significativamente, e incluso en la concentración máxima empleada aumentó (Control =  $12.93 \pm 1.71\%$ ; IL-6

10ng/ml = 11.49±4.58%, p=NS; IL-6 20ng/ml = 19.78±3.51%, p=0.025), por lo que se consideró que este evento NO influía en la disminución del colágeno.

L) Se realizó una estimación de la capacidad del medio de cultivo procedente de distintas concentraciones de la IL-6, para digerir colágeno marcado con H<sup>3</sup> (medición indirecta de la tasa de actividad de colagenasa); se encontró que esta actividad se encontraba aumentada en relación con la concentración utilizada (Control = 4,097dpm; IL-6 5ng/ml = 4,709dpm; IL-6 10ng/ml = 6,239dpm; IL-6 20ng/ml = 3,484dpm), lo que parece indicar que es a través de este proceso que se explica el hallazgo de un efecto paradójico de incremento de estímulo en el promotor de colágeno  $\alpha_1(I)$ , con el correspondiente aumento del RNAm pero una disminución en la cantidad final de colágeno.

### **5.- Conclusiones.**

En base a los resultados obtenidos, se realizamos las siguientes conclusiones:

- La IL-6 NO tiene efectos proliferativos ni citotóxicos sobre los cultivos de lipocitos hepáticos.
- Los lipocitos hepáticos en cultivo presentan un número aproximado de 760 receptores por célula, llegando a una saturación a aproximadamente 400pM.
- La IL-6 tiene un efecto sobre el promotor y el RNAm del procolágeno  $\alpha_1(I)$ , con relación a la concentración y al tiempo de incubación utilizados.

- En la transducción del estímulo que provoca la IL-6 sobre lipocitos hepáticos en cultivo participa una proteína G y una proteína intracelular.

- Esta transducción se lleva a cabo a través de la vía de la PLA<sub>2</sub>-Lipoxigenasa, con influencia de los niveles citosólicos de Calcio.

- El incremento del RNAm de procolágeno  $\alpha_1(I)$  resultado de la estimulación con IL-6 de los lipocitos hepáticos en cultivo NO se refleja en un incremento del porcentaje relativo de colágeno.

- Este efecto está dado por un aumento en la actividad extracelular de la colagenasa, inducida por la IL-6.



## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. **Akira S, Isshiki H, Sugita T y col.** A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO* 1990;9:1897-906.
2. **Alberts B, Bray D, Lewis J y col.** Molecular biology of the cell. Miranda Robertson ed. Segunda edición. ED. *Garland Publishing INC. NY, 1983.*
3. **Andus T, Bauer J, Gerok W.** Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 1991;13:364-75.
4. **Andus T, Gross V, Holstege A y col.** High Interleukin-6 concentrations in hepatic ascites. *Dig Dis Sci* 1994;39:219-20.
5. **Annoni G, Weiner FR, Zern MA.** Increased Transforming Growth Factor-1 gene expression in human liver disease. *J Hepatol* 1992;14:259-64.
6. **Arthur MJ, Friedman SL, Roll FJ y col.** Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen. *J Clin Invest* 1989;84:1076-85.
7. **Arthur MPJ, Stanley A, Iredale JP y col.** Secretion of 72kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity. *Biochem J* 1992;287:701-7.
8. **Bacon B, Britton R.** The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? *Hepatology* 1990;11:127-137.

9. **Banga HS, Simons ER, Brass LF y col.** Activation of phospholipases A and C in Human platelets exposed to epinephrine: role of glycoproteins IIb/IIIa and dual role of epinephrine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9197-9201.
10. **Baud L, Perez J, Friedlander G y col.** Tumor Necrosis Factor stimulates prostaglandin production and cyclic AMP levels in rat cultured mesangial cells. *FEBS lett* 1988;239:50-4.
11. **Bell RM.** Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 1986;45:631-2.
12. **Bell RM, Burns DJ.** Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991;266:4661-4.
13. **Berridge MJ.** Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 1987;56:159-93.
14. **Besterman JM, Duronio V, Cuatrecasas P.** Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: A pathway for generation of a second messenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6785-9.
15. **Bhathal PS, Grossman HJ.** Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol* 1985;1:325.
16. **Biagini G, Ballardini G.** Liver fibrosis and extracellular matrix. *J Hepatol* 1989;8:115-24.

17. **Bianchi FB, Biagini G, Ballardini G y col.** Basement membrane production by hepatocytes in chronic liver disease. *Hepatology* 1984;4:1167-72.
18. **Billah MM, Anthes JC.** The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem J* 1990;269:281-91.
19. **Billah MM, Lapetina EG, Cuatrecasas P.** Phospholipase A<sub>2</sub> activity specific for phosphatidic acid. *J Biol Chem* 1981;256:5399-5403.
20. **Bissell DM, Choun MO.** The role of extracellular matrix in normal liver. *Scand J Gastroenterol* 1988;23(suppl 151):1.
21. **Brenner DA, Westwick J, Breindi M.** Type I collagen gene regulation and the molecular pathogenesis of cirrhosis. *Am J Physiol* 1993;264:G589-95.
22. **Bruix J, Barrera JM, Calvet X y col.** Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989;10:1004-6.
23. **Bucher NLR.** Regeneration of mammalian liver. *International Review of Cytology* 1963;15:245-300.
24. **Burgess GM, Bird GSJ, Obie JF y col.** The mechanism for synergism between phospholipase C- and adenylcyclase-linked hormones in the liver. *J Biol Chem* 1991;266:4772-81.
25. **Byl B, Roucloux I, Crusiaux A y col.** Tumor Necrosis factor  $\alpha$  and Interleukin 6 levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1993;104:1492-7.

26. **Calandra T, Gerain J, Heumann D y col.** High circulating levels of Interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. *Am J Med* 1991;91:23-9.
27. **Calmus Y, Guechot J, Podevin P y col.** Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on Interleukin 1, Interleukin 6 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  production by monocytes. *Hepatology* 1992;16:719-23.
28. **Campos SP, Baumann H.** Insulin is a prominent modulator of the cytokine-stimulated expression of acute-phase plasma protein genes. *Mol Cell Biol* 1992;12(4):1789-97.
29. **Capdevilla JH, Flack JR, Estabrook RW.** Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB* 1992;6:731-6.
30. **Cerbón-Ambriz J, Cerbón-Solórzano J, Rojkind M.** Regulation of collagen production in freshly isolated cell population from normal and cirrhotic rat liver: effect of lactate. *Hepatology* 1991;13:551-6.
31. **Chau LY, Tai HH.** Monoglycerido and diglyceride lipases from human platelet microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1988;963:436-44.
32. **Chen-Kiang S, Hsu W, Natkunam Y y col.** Nuclear signaling by interleukin-6. *Current Opinion in Immunology* 1993;5:124-8.
33. **Choi I, Kang HS, Yang Y y col.** IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis in vivo. *Clin Exp Immunol* 1994;95:530-5.

34. **Choi I, Na WJ, Kang HS y col.** IL-6-Induced calmodulin-dependent protein phosphorylation in B9 hybridoma cells. *J Immunol* 1994;152:1532-7.
35. **Chojkier M, Peterkofsky B, Bateman J.** A new method for determining the extent of proline hydroxylation by measuring changes in the ratio of (4-<sup>3</sup>H):(14C) proline in collagenases digests. *Anal Biochem* 1980;108:385-93.
36. **Chu ML, de Wet W, Bernard M y col.** Fine structural analysis of the human pro $\alpha_1$ (I) collagen gene, promoter structure, Alu I repeats, and polymorphic transcripts. *J Biol Chem* 1985;260:2315-20.
37. **Colombo M, Kuo G, Choo QL y col.** Prevalence of antibodies to hepatic C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989;10:1006-8.
38. **Conricode KM, Brewer KA, Exton JH.** Activation of phospholipase D by protein kinase C. *J Biol Chem* 1992;267:7199-202.
39. **Del Rey A, Besedovsky O.** Metabolic and neuroendocrine effects of pro-inflammatory cytokines. *Eur J Clin Invest* 1992;22(Suppl 1):10-15.
40. **Dennis EA, Rhee SG, Billah MM y col.** Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J* 1991;5:2068-77.
41. **Deviere J, Content J, Denys C y col.** High interleukin-6 levels and increased production by leucocytes in alcoholic liver cirrhosis. Correlation with IgA serum levels and lymphokines production. *Clin Exp Immunol* 1989;77:221-5.

42. **Deviere J, Content J, Denys C.** Immunoglobulin A and Interleukin 6 form a positive secretory feedback loop: a study of normal subjects and alcoholic cirrhotics. *Gastroenterology* 1992;103:1296-1301.
43. **Elias JA, Kotloff R.** Mononuclear cell-fibroblast interactions in the human lung. *Chest* 1991;99(3 suppl):73s-79s.
44. **Elias JA, Lentz V.** IL-1 and Tumor Necrosis Factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J Immunol* 1990;145:161-6.
45. **Emilie D, Coumbaras J, Raphael M y col.** Interleukin-6 production in high-grade B lymphomas: Correlation with the presence of malignant immunoblasts in Acquired Immunodeficiency Syndrome and in Human Immunodeficiency Virus-Seronegative patients. *Blood* 1992;80:498-504.
46. **England PJ.** Intracellular calcium receptor mechanisms. *British Medical Bulletin* 1986;42:375-83.
47. **Eriksson S, Carlson J, Velez R.** Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1986;314:736-9.
48. **Exton JH.** Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J Biol Chem* 1990;265:1-4.
49. **Farago A, Nishizuka Y.** Proteinkinase C in transmembrane signaling. *FEBS Lett* 1990;268:350-4.

50. **Fattovich G, Brollo L, Giustina G y col.** Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B. *Gut* 1991;32:294.
51. **Feder LS, Todaro JA, Laskin DL.** Characterization of interleukin-1 and interleukin-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 1993;53:126-32.
52. **Feinber AP, Vogelstein B.** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;132:6-13.
53. **Flaherty M, Chojkier M.** Selective inhibition of collagen synthesis by the  $Ca^{++}$  ionophore A23187 in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1986;261:12060-5.
54. **Floru S, Gelvan A, Maran R y col.** Modulation of tissue plasminogen activator biosynthesis by phosphatidylinositol liposomes in human fetal lung fibroblasts. *Am J Hematol* 1991;36:100-4.
55. **Friedman S, Roll FJ, Boyles J y col.** Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8681-5.
56. **Friedman S.** The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-35.
57. **Furmanski P, Neilson E, Bhorjee J.** The role of cytokines in the regulation of cell function and in the pathogenesis of disease: a pathology A/pathology B study section workshop. *Cancer Res* 1992;52:6129-33.

58. **Geerts A, Vrijzen R, Rauterberg J y col.** In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J Hepatol* 1989;9:59-68.
59. **Geesin JC, Hendricks LJ, Gordon JS y col.** Modulation of collagen synthesis by growth factors: the role of ascorbate-stimulated lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1991;289:6-11.
60. **Geoffrey LG.** Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 1987;252:c1-c9.
61. **Greenwel P, Rubin J, Schwartz M y col.** Liver fat-storing cell clones obtained from a CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, Interleukin-6, and Connexin 43. *Lab Invest* 1993;69:210-6.
62. **Greenwel P, Solís-Herruzo JA, Rojkind M.** Interleukin-6 (IL-6) stimulates the expression of  $\alpha 1(I)$  procollagen mRNA in cultured fat-storing cells. *Hepatology* 1991;12:114.
63. **Greenwel P, Schwartz M, Rosas M y col.** Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers. *Lab Invest* 1989;65:644-53.
64. **Gressner AM.** Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. *Eur J Chem Clin Biochem* 1991;29:293-311.



65. **Gressner AM, Lotfi S, Gressner G y col.** Identification and partial characterization of a Hepatocyte-Derived Factor promoting proliferation of cultured fat-storing cells (parasinusoidal lipocytes). *Hepatology* 1992;16:1250-66.
66. **Guaragna RM, Trugo L, Borojevic R.** Phospholipid modifications during conversion of hepatic myofibroblasts into lipocytes (Ito-cell). *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:237-43.
67. **Hagiwara T, Suzuki H, Kono I y col.** Regulation of fibronectin synthesis by Interleukin-1 and Interleukin-6 in rat hepatocytes. *Am J Pathol* 1990;136:39-47.
68. **Hahn G, Wick G, Pencev D y col.** Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin and fibronectin. *Gut* 1980;21:63-71.
69. **Harbers K, Kuehn M, Delius H y col.** Insertion of retrovirus into the first intron of  $\alpha_1(I)$  collagen gene leads to embryonic lethal mutation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:1504-8.
70. **Hassell JR, Robey PG, Barrach JH y col.** Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4494-8.
71. **Heinrich PC, Castell JV, Andus T.** Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621-36.
72. **Hendriks HFJ, Brouwer A, Knook DL.** The role of hepatic fat-storing (stellate) cells in retinoid metabolism. *Hepatology* 1987;7:1368.

73. **Hernandez-Muñoz I, De La Torre MP, Pedraza MA y col.** Toxic oil stimulates collagen synthesis acting at a pretranslational level in cultured fat-storing cells. *Gastroenterology* 1994;106:691-701.
74. **Hibi M, Murakami M, Saito M y col.** Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990;63:1149-57.
75. **Hirano T, Yasukawa K, Harada H y col.** Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324:73-6.
76. **Holt K, Bennett M, Chojkier M.** Acetaldehyde stimulates collagen and noncollagen protein production by human fibroblasts. *Hepatology* 1984;4:843-8.
77. **Houglum K, Buck M, Adir V y col.** LAP (NF-IL6) transactivates the collagen alpha1(I) gene from a 5' regulatory region. *J Clin Invest* 1994;94:808-14.
78. **Hsu W.** Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol* 1994;14:268-76.
79. **Huang C, Cabot MC.** Phospholipase D activity in nontransformed and transformed fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1992;1127:242-8.
80. **Iredale JP, Murphy G, Hembry RM y col.** Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* 1992;90:282-7.

81. **Irvine RF.** Calcium transients: mobilization of intracellular  $\text{Ca}^{++}$ . *British Medical Bulletin* 1986;42:369-74.
82. **Irvine RF.** How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?. *Biochem J* 1982;204:3-16.
83. **Ishimi Y, Miyaura C, He Jin C y col.** IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990;145:3297-3303.
84. **Jimenez SA, Varga J, Olsen A y col.** Functional analysis of human  $\alpha 1(\text{I})$  procollagen gene promoter. *J Biol Chem* 1994;269:12684-91.
85. **Kakumo S, Fukatsu A, Shinagawa T y col.** Localization of intrahepatic interleukin 6 in patients with acute and chronic liver disease. *J Clin Pathol* 1992;45:408-11.
86. **Kanoh H, Yamada K, Sakane F.** Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction? *Trends in Biol Sci* 1990;15:47-50.
87. **Karsenty G, de Crombrugge B.** Two different negative and positive regulatory factors interact with a short promoter segment of the  $\alpha_1(\text{I})$  collagen gene. *J Biol Chem* 1990;265:9934-42.
88. **Kato H, Hayashi T, Koshino Y y col.** Glucocorticoids increase  $\text{Ca}^{++}$  influx through dihydropyridine-sensitive channels linked to activation of protein kinase C in vascular smooth muscle cells. *Bioch Biophys Res Comm* 1992;188:934-41.

89. **Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ y col.** Circulating Tumor Necrosis Factor, Interleukin-1 and Interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 1991;13:267-76.
90. **Kishimoto T.** The biology of Interleukin-6. *Blood* 1989;74:1-10.
91. **Kishimoto T, Akira S, Taga T.** Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science JPN* 1992;258:593-7.
92. **Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR.** Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol* 1981;88:473-85.
93. **Knittel T, Schuppan D, Meyer Zun Büschenfelde KH y col.** Differential expression of collagen types I, III and IV by fat-storing (Ito) cells In Vitro. *Gastroenterology* 1992;102:1724-35.
94. **Lanser ME, Brown GE.** Stimulation of rat hepatocyte fibronectin production by monocyte-conditioned medium is due to interleukin 6. *J Exp Med* 1989;170:1781-6.
95. **Lichtler A, Stover ML, Angilly J y col.** Isolation and characterization of the rat  $\alpha_1(I)$  collagen promoter. Regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem* 1989;264:3072-7.
96. **Lindblad WJ, Fuller GC.** Differential susceptibility of hepatic collagenous matrix to vertebrate collagenase degradation in normal and cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1981;80:1340.

97. **Liska DJ, Slack JL, Dornstein P.** A highly conserved intronic sequence is involved in transcriptional regulation of the  $\alpha 1(I)$  collagen gene. *Cell Regulation* 1990;1:487-98.
98. **MacNicol M, Schulman H.** Cross-talk between protein kinase C and multifunctional  $Ca^{++}$ /calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1992;267:12197-201.
99. **Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.** Molecular cloning, a Laboratory manual. *ED Cold Spring Harbor Laboratory Publications. NY, 1982.*
100. **Margis R, Pinheiro-Margis M, da Silva LCF y col.** Effects of retinol on proliferation, cell adherence and extracellular matrix synthesis in a liver myofibroblast or lipocyte cell line (GRX). *Int J Exp Path* 1992;73:125-35.
101. **Marshall JB.** Bleeding esophagogastric varices. *Postgrad Med* 1991;89:147-50,155-8.
102. **Martin GR, Kleinman HK.** The extracellular matrix component in development and in disease. *Semin Liver Dis* 1985;5:147-56.
103. **Martin TW, Wysolmerski RB, Lagunoff D.** Phosphatidylcholine metabolism in endothelial cells: evidence for phospholipase A and a novel  $Ca^{++}$ -independent phospholipase C. *Bioch Bioph Acta* 1987;917:296-307.
104. **Martinez-Hernandez A.** The hepatic extracellular matrix. II: Electron immunohistochemical studies in rats with  $CCl_4$  induced cirrhosis. *Lab Invest* 1985;53:166-86.

105. **Maruyama K, Feinman L, Fainsilver Z y col.** Mammalian collagenase increases in early alcoholic liver disease and decreases with cirrhosis. *Gastroenterology* 1981;80:1341.
106. **Matsuda T, Hirano T.** Association of p72 Tyrosine Kinase with Stat Factors and its activation by Interleukin-3, Interleukin-6, and Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Blood* 1994;83:3457-61.
107. **Mauco G, Fauvel J, Chap H y col.** Studies on enzymes related to diacylglycerol productions in activated platelets. II. Subcellular distribution, enzymatic proprieties and positional specificity of diacylglycerol- and monoacylglycerol-lipases. *Biochim Biophys Acta* 1984;796:169-77.
108. **Mauviel A, Redini F, Hartmann DJ y col.** Modulation of human dermal fibroblast extracellular matrix metabolism by the lymphokine Leukoregulin. *J Cell Biol* 1991;113:1455-62.
109. **McKay I y Leigh I.** Growth factors. Rickwood D y Hames BD ed. *ED. IRL PRESS. Oxford, 1993.*
110. **Milani S, Herbst H, Schuppan D y col.** In situ hybridization for procollagen types I, II and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 1989;10:84-92.
111. **Milani S, Herbst H, Schuppan D y col.** Cellular localization of type I, III, and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1990;137:59-70.

112. **Miyamoto T, Itoh M, Noguchi Y y col.** Role of intracellular  $Ca^{++}$  and the calmodulin messenger system in pepsinogen secretion from isolated rabbit gastric mucosa. *Gut* 1992;33:21-5.
113. **Moller S, Sorensen TIA, Tygstrup N.** Who benefits from endoscopic esclerotherapy of bleeding oesophageal varices?. Proposal for differential indications. *J Hepatol* 1992;15:184-91.
114. **Moolenaar WH, Kruijer W, Tilly BC y col.** Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* 1986;323:171-3.
115. **Morgan MY.** The epidemiology of alcoholic liver disease in the United Kingdom. *Alcoholic Liver Diseases*, Halle P ed., p. 193. *ED. Eduard Arnold. London, 1985.*
116. **Mosher DF.** Fibronectin and liver disease. *Hepatology* 1986;6:1419-21.
117. **Müller C, Zielinski C.** Interleukin-6 production by peripheral blood monocytes in patients with chronic liver disease and acute viral hepatitis. *J Hepatol* 1992;15:372-7.
118. **Muraguchi A, Kishimoto T, Miki Y y col.** T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J Immunol* 1981;127:412.
119. **Murakami M, Narazaki M, Hibi M y col.** Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:11349-53.

120. **Nakashima S, Nagata KI, Veeda K y col.** Stimulation of arachidonic acid releas by guanine nucleotide in saponin-permeabilized neutrophils: evidence for involvement of GTP-binding protein in phospholipase  $A_2$  activation. *Arch Biochem Biophys* 1988;261:375-83.
121. **Narazaki M, Yasukawa K, Saito T y col.** Soluble forms of the Interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 1993;82:1120-6.
122. **Natsuka S, Isshiki H, Akira S y col.** Augmentation of haptoglobin production in Hep3B cell line by a nuclear factor NF-IL6. *FEBS* 1991;291:58-62.
123. **Navab M, Liao F, Hough GP y col.** Interaction of monocytes with cocultures of human aortic wall cells involves Interleukins 1 and 6 with marked increases in connexin43 message. *J Clin Invest* 1991;87:1763-72.
124. **Neer EJ, Clapham DE.** Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 1988;333:129-34.
125. **Neki R, Matsuzaki N, Yamanaka K y col.** The Interleukin-6 (IL-6)/IL-6-receptor sistem induces Human Chorionic Gonadotropin production by activating Tyrosine Kinase-dependent signal transduction pathway different from pathways triggered by Protein Kinase Activators including Gonadotropin Releasing Hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:704-9.
126. **Nesbitt JE, Fuller GM.** Dynamics of Interleukin-6 internalization and degradation in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1992;267:5739-42.



127. **Nishizuka Y.** The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 1984;308:693-8.
128. **Nolan J.** Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury-An idea whose time has come again. *Hepatology* 1989;10:887-91.
129. **Ogata I, Mochida S, Tomiya T y col.** Minor contribution of hepatocytes to collagen production in normal and early fibrotic rat livers. *Hepatology* 1991;14:361-7.
130. **Ohzato H, Yoshizaki K, Nishimoto N y col.** Interleukin-6 as a new indicator of inflammatory status: Detection of serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein after surgery. *Surgery* 1992;111:201-9.
131. **Okazaki I, Murayama K.** Collagenase activity in experimental hepatic fibrosis. *Nature* 1974;252:49-50.
132. **Pacifici R, Basilico C, Roman J y col.** Collagen-induced release of interleukin 1 from human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1992;89:61-7.
133. **Perez-Tamayo R, Montfort I.** The susceptibility of hepatic collagen to homologous collagenase in human and experimental cirrhosis of the liver. *Am J Pathol* 1980;100:427-42.
134. **Peterkofsky B, Chojkier M, Bateman J.** Immunochemistry of the Extracellular Matrix. Furthmayr H. ed., Vol. 2 pp 19-47. *ED. CRC Press Inc. Boca Raton, Fl.*

135. **Peterkofsky B, Diegelman R.** Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* 1971;10:988-94.
136. **Pierce RA, Glaug MR, Greco RS y col.** Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J Biol Chem* 1987;262:1652-8.
137. **Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J y col.** Serum cytokine levels in human septic shock. *Chest* 1993;103:565-75.
138. **Pisi E, Bianchi FB, Ballardini G y col.** Hepatic fibroplastia: an evaluation of tissue and serological parameters. *Front Gastrointest Res* 1984;8:106-16.
139. **Pluznik DH, Friedman R, Rich R.** Correlation in the expression of type IV collagenase and the invasive and chemotactic abilities of myelomonocytic cells during differentiation into macrophages. *Exp Hematol* 1992;20:57-61.
140. **Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L y col.** The biosynthesis of collagen and its disorders (First of two parts). *N Engl J Med* 1979;301:13-23.
141. **Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L y col.** The biosynthesis of collagen and its disorders (Second of two parts). *N Engl J Med* 1979;301:77-85.
142. **Poupart P, Vandenabeele P, Cayphas S y col.** B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF). *EMBO J* 1987;6:1219-24.

143. **Ramirez F, Di Liberto M.** Complex and diversified regulatory programs control the expression of vertebrate collagen genes. *FASEB J* 1990;4:1616-23.
144. **Rappaport AM.** The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr Path* 1976;157:215.
145. **Rhee SG.** Inositol phospholipid-specific phospholipase C: interaction of the  $\gamma_1$  isoform with tyrosine kinase. *Trends in Biol Sci* 1991;16:297-301.
146. **Richards CD, Shoyab M, Brown TJ y col.** Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture. *J Immunol* 1993;150:5596-603.
147. **Rigo GP, Merighi A, Chahia NJ y col.** A prospective study of the hability of three endoscopic classifications to predict hemorrhage from esophageal varices. *Gastrointest Endosc* 1991;38:425-9.
148. **Ritzenthaler JD, Goldstein RH, Lichtler A y col.** Transforming-growth-factor- $\beta$  activation elements in the distal promoter regions of the rat  $\alpha_1$  type I collagen gene. *Biochem J* 1991;280:157-62.
149. **Rockey DC, Maher JJ, Jarnagin WR y col.** Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by Interferon- $\gamma$ . *Hepatology* 1992;16:776-84.
150. **Roeb E, Graeve L, Hoffmann R y col.** Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gen expression by cytokines and dexamethasone in rat hepatocyte primary cultures. *Hepatology* 1993;18:1437-42.

151. **Rojkind M, Dunn MA.** Hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 1979;76:849-63.
152. **Rojkind M, Giambrone MA, Bienpica L.** Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 1979;76:710-9.
153. **Roodman GD.** Interleukin-6: an osteotropic factor?. *J Bone Miner Res* 1992;7:475-8.
154. **Rossi F, Grzeskowiak M, Della Bianca V y col.** De novo synthesis of diacylglycerol from glucosa. A new pathway of signal transduction in human neutrophils stimulated during phagocytosis of  $\beta$ -glucan particles. *J Biol Chem* 1991;266:8034-8.
155. **Rustembeck I, Lenzen S.** Regulation of transmembrane ion transport by a reaction products of phospholipase A<sub>2</sub>. II. Effects of arachidonic acid and other fatty acids on mitochondrial Ca<sup>++</sup> transport. *Biochim Biophys Acta* 1989;982:147-55.
167. **Schaffner F, Popper H.** Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology* 1963;44:239-42.
157. **Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock S y col.** The pathology of hepatitis C. *Hepatology* 1992;15:567-71.
158. **Schooltink H, Schmitz-Van de Leur H, Heinrich PC y col.** Up-regulation of the interleukin-6-signal transducing protein (gp130) by interleukin-6 and dexamethasone in HepG2 cells. *FEBS* 1992;297:263-5.

159. **Sherlock S, Dooley J.** Diseases of the liver and biliary system. Sheila Sherlock & James Dooley eds. *ED. Blackwell Scientific Publications. Londres, 1993.*
160. **Shingu M, Nagai Y, Isayama T y col.** The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol 1993;94:145-9.*
161. **Silk ST, Clejan S, Witkom K.** Evidence of GTP-binding protein regulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity in isolated human platelet membranes. *J Biol Chem 1989;264:21466-9.*
162. **Smedsrod B, Johansson S, Pertroft H.** Studies in vivo and in vitro on the uptake and degradation of soluble collagen 1(I) chains in rat liver endothelial and Kupffer cells. *Biochem J 1985;228:415-24.*
163. **Solis-Herruzo JA.** Bases moleculares de la fibrosis hepática. *Gastroenterología y Hepatología 1988;11:463-83.*
164. **Sweatt JD, Blair IA, Cragoe EJ y col.** Inhibitors of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange block epinephrine- and ADP-induced stimulation of human platelet phospholipase C by blockade of arachidonic acid release at a prior step. *J Biol Chem 1986;261:8660-6.*
165. **Sweatt JD, Connolly TM, Cragoe EJJr y col.** Evidence that Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulates receptor-mediated phospholipase A<sub>2</sub> activation in human platelets. *J Biol Chem 1986;261:8667-73.*

167. **Taga T, Hibi M, Hirata Y y col.** Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989;58:573-81.
167. **Terés J, Bosch J.** Esclerosis de várices y obliteración transparietal. En: Rodés J ed. *Monografías Clínicas en Gastroenterología. ED. DOYMA. Barcelona 1991.*
168. **Thomas PS.** Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci* 1980;77:5201-5.
169. **Thompson HL, Burbelo PD, Gabriel G y col.** Murine mast cells synthesize basement membrane components. *J Clin Invest* 1991;87:619-23.
170. **Tilg H, Vogel W, Wiedermann CJ y col.** Circulating Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor antagonists in liver disease. *Hepatology* 1993;18:1132-8.
171. **Tilg H, Wilmer A, Vogel W y col.** Serum levels of cytokines in chronic liver disease. *Gastroenterology* 1992;103:264-74.
172. **Timpl R, Glanville RW, Wick G y col.** Immunochemical study on basement membrane (type IV) collagens. *Immunology* 1979b;38:109-16.
173. **Van Zantenn RAA, Van Leeuwen RE, Wilson JHP.** Serum procollagen III N-terminal peptide and laminin P1 fragment concentrations in alcoholic liver disease and primary biliar cirrhosis. *Clin Chim Acta* 1988;177:141-6.
174. **Von der Mark H, Aumailley M, Wick G y col.** Immunochemistry, genuine size and tissue localization of collagen VI. *Eur J Biochem* 1984;142:493-502.

175. **Weiner FR, Giambrone MA, Czaja MJ y col.** Ito-Cell gene expression and collagen regulation. *Hepatology* 1990;11:111-7.
176. **Welgus HG, Campbell EJ, Cury JD y col.** Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J Clin Invest* 1990;86:1496-1502.
177. **Weissenbach.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7152.
178. **White BA, Bancroft FC.** Cytoplasmic dot hybridization. Simple analysis of relative mRNA levels in multiple small cell or tissue samples. *J Biol Chem* 1982;257:8569-72.
179. **Wlaschek M, Bolsen K, Herrmann G y col.** UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived-collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage?. *J Invest Dermatol* 1993;101:164-8.
180. **Yamasaki K, Taga T, Hirata Y y col.** Cloning and expression of the human Interleukin-6 (BSF-2/IFN $\beta$  2) receptor. *Science* 1988;241:825-8.
181. **Yamashita S, Ogawa M, Abe T y col.** Group II phospholipase A2 in invasive gastric cancer cell line is induced by interleukin 6. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:878-84.
182. **Yoshikawa M, Tsujii T, Matsumura K y col.** Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses. *Hepatology* 1992;16:358-64.