



Casa abierta al Tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“PAPEL PLEIOTRÓPICO DE LA
INTERLEUCINA-10 EN LA APOPTOSIS DE
HEPATOCITOS”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA LA

MBE Aída Mariana Santiago Lomelí

Comité Tutorial:

TUTOR: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz

Asesores: Dr. David Kershenobich Stalnikowitz

Dr. Rogelio Hernández Pando

Dra. Leticia Bucio Ortiz

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

México, D.F.

Marzo, 2005

El Posgrado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa forma parte del Padrón de Programas del PIFOP-CONACYT, clave C/PFPN-2002-35-32.

Para la realización de este trabajo de investigación la MBE Aída Mariana Santiago Lomelí contó con el apoyo de CONACYT mediante la beca 152990 para sus estudios de Doctorado.

También, este trabajo fue financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 400200-5-34195.

JURADO:

Dr. David Kershenobich Stalnikowitz
Departamento de Medicina Experimental UNAM

Dr. Guillermo Robles Díaz
Departamento de Medicina Experimental UNAM

Dr. Rogelio Hernández Pando
Departamento de Patología INCMNSZ

Dra. Leticia Bucio Ortiz
Departamento de Ciencias de la Salud
UAM-I

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz
Departamento de Ciencias de la Salud
UAM-I

AGRADECIMIENTOS

A Sebastián, mi hijo, por ser el motor de mi vida y acompañarme durante todos los experimentos y la escritura de esta tesis.

A mi madre, Aída, por su apoyo incondicional y su amor infinito.

A la Dra. Conchita, por ser la guía durante todo el camino.

Al Dr. Kershenobich, por la confianza para pertenecer a su grupo.

A todos mis compañeros de laboratorio que contribuyeron en la realización de este trabajo.

RESUMEN

La apoptosis o muerte celular programada es un evento esencial que contribuye al daño hepático y el claro entendimiento del papel que juega en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas abre posibilidades terapéuticas.

Existen varios estudios que indican que las citocinas pro-inflamatorias, como el TNF- α y el TGF- β pueden inducir apoptosis en hepatocitos, sin embargo, el papel de las citocinas anti-inflamatorias no ha sido estudiado en este contexto. Se ha propuesto que los niveles de una sola citocina no son tan importantes en determinar la presentación clínica, como lo es la relación entre citocinas pro y anti-inflamatorias.

Las citocinas anti-inflamatorias son una serie de moléculas inmunoreguladoras que controlan la respuesta de citocinas pro-inflamatorias. Actualmente, se ha reconocido su papel fisiológico en el proceso de inflamación y su participación patológica en el estado inflamatorio sistémico. En particular, la IL-10 inhibe la síntesis de varias citocinas como el IFN- γ , la IL-2 y el TNF- α en subpoblaciones Th1, pero no en células Th2.

El presente estudio muestra el efecto de la citocina anti-inflamatoria, IL-10, en la apoptosis de hepatocitos, el cual no involucra eventos clave en la cascada apoptótica, como son la activación de caspasa-3, la disrupción del potencial de membrana mitocondrial o la activación de ciertos genes pro y anti-apoptóticos. El efecto observado parece relacionarse con la activación del NF- κ B, factor de transcripción encargado de la expresión de genes de supervivencia.

Así mismo, se comprueba la importancia del tipo celular al tratar de caracterizar los efectos de las citocinas, ya que en hepatocitos de rata en cultivo primario, la IL-10 tiene un efecto pro-apoptótico, mientras que en células de hepatoblastoma humano el efecto es contrario.

Este trabajo contribuye con nuevos conocimientos acerca del mecanismo mediante el cual, la IL-10 afecta la apoptosis de hepatocitos a través de un efecto diferencial en la activación del NF- κ B.

ABSTRACT

Current data suggests that hepatocyte apoptosis is an essential feature contributing to several chronic liver diseases. Increasing evidence indicates that apoptosis is a prominent feature and may be responsible for the cellular death of hepatocytes and loss of liver function. While there are many studies indicating that pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and TGF- β can induce hepatocyte apoptosis, the role of anti-inflammatory cytokines has not been thoroughly examined in this context. It may not be the absolute level of a particular cytokine that is most important, but the ratio of pro and anti-inflammatory cytokines that may determine the clinical presentation. The anti-inflammatory cytokines are a series of immunoregulatory molecules that control the pro-inflammatory cytokine response. In particular, IL-10 inhibits the synthesis of a number of cytokines such as INF- γ , IL-2 and TNF- α on TH1 subpopulations of T-cells.

The present study shows the effect of the anti-inflammatory cytokine, IL-10, on hepatocyte apoptosis. This effect is related with the activation of NF- κ B, transcriptional factor involved in survival gene expression, but not with key events on the signaling cascade of apoptosis.

The present study demonstrates the importance of differential cell marking when trying to characterize the effects of cytokines in their contribution to liver cell apoptosis. IL-10 has a pro-apoptotic effect on primary cultured rat hepatocytes, while it prevents apoptosis of hepatoma cells.

The study provides insight into the mechanisms by which IL-10 affects apoptosis through a differential effect on NF- κ B activation.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Daño hepático: cirrosis	2
1.2 Apoptosis	3
-Generalidades	3
-Células tipo I y II	5
1.3 Apoptosis y daño hepático	6
-Enfermedad hepática alcohólica	6
-Hepatitis viral	7
-Colestasis	7
-Enfermedad de Wilson	8
-Apoptosis y su relación con fibrosis	8
1.4 Mecanismos moleculares de la apoptosis en la enfermedad hepática alcohólica (EHA)	10
-EHA y apoptosis	11
-Regulación mitocondrial de la apoptosis inducida por alcohol en hepatocitos	13
-Efecto del etanol en la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria	14
1.5 Señalización del TNF- α en apoptosis	16
1.6 Interleucina-10	18
-Generalidades	18
-IL-10 y apoptosis	20
1.7 Factor Nuclear- κ B	21
2. OBJETIVO	24
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	26
4.1 Inducción de apoptosis en hepatocitos en cultivo primario	27
4.2 Efecto de la IL-10 en la apoptosis inducida	27
4.3 Activación del Factor Nuclear- κ B	28
4.4 Efecto de la IL-10 en la apoptosis de células HepG2	29

5. MÉTODOS	30
5.1 Aislamiento de hepatocitos	31
5.2 Cultivo celular	31
5.3 Determinación de apoptosis temprana	32
5.4 Determinación de apoptosis tardía	32
5.5 Determinación de caspasa-3 activa	33
5.6 Determinación de la disrupción de potencial de membrana mitocondrial	34
5.7 Extracción de ARN total de los extractos celulares	35
5.7 RT-PCR	36
5.8 Preparación de los extractos nucleares	36
5.10 Ensayo de electromovilidad	37
5.11 Western Blot	37
5.12 Análisis estadístico	38
6. RESULTADOS	39
6.1 Inducción de apoptosis en hepatocitos en cultivo primario	40
6.2 Efecto de la IL-10 en la apoptosis inducida por TNF- α	43
6.3 Efecto de la IL-10 en la apoptosis inducida por etanol	50
6.4 Efecto de la IL-10 en la apoptosis inducida por disminución de glutatión causada por BSO y etanol	55
6.5 Expresión de Bcl-2	61
6.6 Activación del Factor Nuclear- κ B	62
6.7 Efecto de la IL-10 en la apoptosis inducida por cicloheximida/TNF- α en células HepG2	65
7. DISCUSIÓN	66
8. CONCLUSIONES	73
9. BIBLIOGRAFÍA	74
10. ARTÍCULO PUBLICADO	83

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DAÑO HEPÁTICO: CIRROSIS

La cirrosis es una enfermedad hepática crónica que cursa con lesión hepatocelular, fibrosis y nódulos de regeneración. Existen puentes de tejido conectivo que unen a las tríadas portales entre sí y a las tríadas portales con la vena central, pérdida de la arquitectura normal del hígado y cortocircuitos vasculares. Este proceso no sólo afecta la forma sino también la función hepática debido a la fibrosis presente, formada por acumulación de matriz extracelular.

En nuestro país, la cirrosis se encuentra entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad en individuos de 15 a 55 años. La causa principal hasta hace algunos años era el alcoholismo, sin embargo, en años recientes la infección crónica por el virus de la hepatitis C ha ocupado el primer lugar entre las etiologías de las cirrosis.

El principal evento en la génesis de la cirrosis es el aumento en la producción y depósito de matriz extracelular, sobre todo colágena. Una de las características de las bandas fibróticas en el hígado cirrótico es la presencia de miofibroblastos, los cuales son células estelares activadas secretoras de grandes cantidades de matriz extracelular. Estas células se encuentran en el espacio de Disse, por lo que las bandas de colágena se generan en estas áreas.

Dos son las principales causas de los signos y síntomas del paciente cirrótico: la insuficiencia hepática y la hipertensión portal y los diferentes grados de combinación de ambos. Las principales características de los pacientes con cirrosis son la encefalopatía, la retención hídrica, la hemorragia digestiva por hipertensión portal y la falla en la síntesis de proteínas hepáticas.

1.2 APOPTOSIS

Generalidades

La apoptosis es una forma de muerte celular caracterizada por fragmentación nuclear y celular organizada. Durante la apoptosis, las células se fragmentan en pequeños cuerpos con organelos y membrana plasmática intacta. La fragmentación ordenada del DNA es una característica bioquímica importante en este evento. Primeramente, las endonucleasas rompen el DNA en fragmentos de 50-300 kb y posteriormente en piezas más pequeñas de alrededor de 180 a 200 pares de bases. Finalmente, las células apoptóticas, llamadas cuerpos apoptóticos, son removidos por fagocitosis.

Normalmente, las células apoptóticas se eliminan sin generar una respuesta inflamatoria, debido a que los constituyentes intracelulares se encuentran rodeados por la membrana plasmática de los cuerpos apoptóticos (Galle,1997).

Durante la apoptosis, se pueden distinguir una fase de iniciación y una de ejecución.

En la fase de iniciación intervienen los receptores de muerte que son miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Hasta ahora, se han descrito ocho receptores, de los cuales el receptor TNF-1 (TNF-R1) y el Fas (CD95/APO-1) son los mejor caracterizados. Cuando ambos receptores son activados por sus ligandos, reclutan un complejo intracelular de muerte que consiste en proteínas adaptadoras y procaspasas. Este complejo de muerte activa una serie de proteínas denominadas caspasas, sobre todo caspasa 8, que subsecuentemente activa a las caspasas efectoras.

En la fase de ejecución, las caspasas, una familia de proteasas, desmantelan a la célula mediante activación secuencial y rompimiento de proteínas clave. Las caspasas se encuentran presentes en el citosol de la mayoría de las células como zimógenos y necesitan ser activadas a proteasas completamente funcionales mediante ruptura de la proenzima por proteólisis. Las caspasas rompen a las proteínas en el lado carboxilo de residuos de aspartato. Debido a que las

caspasas también son activadas por ruptura en los residuos de aspartato, se piensa que son activadas por otras caspasas.

Ciertas caspasas, (-3,-6,-7) se denominan efectoras, debido a que rompen sustratos claves y eventualmente generan muerte celular apoptótica. Actualmente, se conocen dos vías importantes que activan a estas caspasas efectoras, una involucra factores y receptores de muerte, y la otra disfunción mitocondrial.

En la segunda vía, el estrés celular puede provocar que se libere citocromo C de la mitocondria, mediado probablemente por cambios en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial. El citocromo C se une a Apaf-1 (factor 1 apoptótico activador de proteasas) que activa a la caspasa-9. En este punto las vías convergen, debido a que la caspasa-9 activa a las caspasas efectoras mencionadas anteriormente (Figura 1).

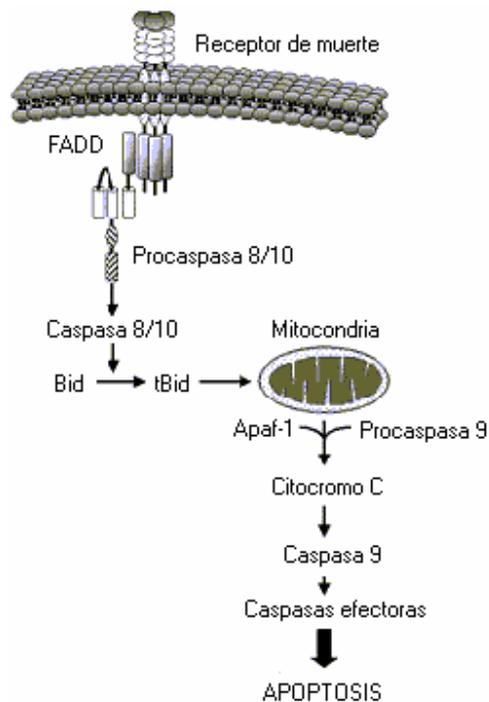


Figura 1. Cascada de eventos en apoptosis

Varias proteínas citoplasmáticas se encuentran involucradas en la regulación de la apoptosis, particularmente miembros de la familia Bcl-2. Por lo menos se han identificado 15 diferentes proteínas Bcl-2 y pueden subdividirse en pro y anti-apoptóticas. Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-1 y A1 inhiben la apoptosis, mientras que Bax, Bak, Bcl-xS, Bag, Bid, Bik, Hrk y Bad promueven la apoptosis en mamíferos.

Los miembros de la familia Bcl-2 tanto pro como anti-apoptóticos pueden asociarse y formar complejos, para realizar sus respectivas funciones. Aparentemente, las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas pueden unirse a la mitocondria e inhibir la liberación de citocromo C. A pesar de que las funciones precisas de la familia Bcl-2 en la modulación de la apoptosis no están totalmente claras, el balance entre sus diferentes miembros dentro de la célula, determinará si un estímulo apoptótico causará que la célula entre en apoptosis (Rust y Gores, 2000).

Células tipo I y tipo II

La señalización después de la formación del complejo inductor de muerte difiere entre las llamadas células tipo I, de las células tipo II. En las tipo I, la caspasa-8 se activa en el complejo de muerte y rápidamente lleva al rompimiento de la caspasa-3 de forma independiente de la vía mitocondrial que activa esta caspasa. Por el contrario, en las células tipo II como los hepatocitos, la mitocondria es esencial para la apoptosis mediada por receptores de muerte. En esta vía, las caspasas iniciadoras, caspasa 8 y 10, rompen el dominio pro-apoptótico BH3 de Bid. Esta proteína Bid truncada, se transloca hacia la mitocondria induciendo la liberación de citocromo C. El citocromo C citosólico se une a Apaf-1, facilitando el reclutamiento de la caspasa-9 en el apoptosoma. La caspasa 9 activada rompe a las caspasas 3 y 7 generando apoptosis. Fas dispara la activación de la mitocondria tanto en células tipo I como en las tipo II. Sin embargo, sólo en las tipo II, la apoptosis es bloqueada por la sobre-expresión de Bcl-2 o Bcl-XL, miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2.

Por lo tanto, en las células tipo II la mitocondria es esencial para la ejecución de la apoptosis, mientras que en las células tipo I, la disrupción mitocondrial funciona como amplificador de la señal apoptótica (Scaffidi y col., 1998).

1.3 APOPTOSIS Y DAÑO HEPÁTICO

Enfermedad hepática alcohólica

Estudios recientes han reportado que en la hepatitis alcohólica la apoptosis de los hepatocitos se encuentra aumentada significativamente. Más aún, el número de células apoptóticas se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Natori y col., 2001).

Varios mecanismos han sido asociados con la apoptosis inducida por alcohol en hepatocitos, tales como el estrés oxidativo y los procesos mediados por receptores de muerte. Las especies reactivas de oxígeno pueden causar disfunción mitocondrial, provocando la liberación de factores pro-apoptóticos tales como el citocromo c. La señalización mediada por receptores de muerte también ha sido asociada con la apoptosis inducida por alcohol, especialmente por Fas y TNF- α . El receptor Fas se encuentra altamente expresado en hepatocitos de pacientes con hepatitis alcohólica comparada con individuos sanos. Los niveles de Fas soluble y ligando de Fas (FasL) se encuentran aumentados en pacientes con hepatitis alcohólica severa. La expresión de FasL en hepatocitos puede llevar a que los hepatocitos positivos-FasL puedan inducir apoptosis en hepatocitos FasL-positivos adyacentes. Esta forma de muerte entre células vecinas se ha nombrado "fratricida" (Taieb y col, 1998).

El TNF- α se encuentra involucrado de forma importante en la hepatitis alcohólica. Los niveles séricos de esta citocina/ligando de muerte se encuentran incrementados en esta enfermedad y se correlacionan con la mortalidad. El

alcohol puede sensibilizar a los hepatocitos a la apoptosis mediada por TNF- α mediante la disminución de glutatión mitocondrial o alterando el estado redox de la célula. Estas observaciones sugieren que una terapia anti-apoptótica podría ser benéfica en la hepatitis alcohólica (Collel y col., 1998).

Hepatitis viral

Se ha reconocido que la apoptosis participa de forma significativa en la patogénesis de la hepatitis viral. Cuerpos apoptóticos se encuentran presentes en el tejido hepático de pacientes con hepatitis viral. Diferentes vías, que incluyen a los sistemas Fas y TNF- α , así como al sistema perforina/granzima, están involucradas en los procesos apoptóticos de los hepatocitos en la hepatitis viral. Las determinaciones de la actividad de caspasas en tejido hepático de pacientes infectados con virus C se correlacionan con el daño hepático. La expresión de Fas y del TNF-R1 se encuentran elevadas en la hepatitis por virus B y C, así como la producción de TNF- α . Sin embargo, la proteína de la cubierta del virus B y C parece activar al NF-kB mediante un mecanismo dependiente del TNF-R1, lo que indicaría que estos virus podrían tener efectos tanto pro como anti-apoptóticos en la señalización por TNF- α (Bantel y col., 2001).

Colestasis

En la colestasis, las concentraciones elevadas de ácidos biliares promueven el daño hepático y el desarrollo de cirrosis y falla hepática. *In vitro*, los ácidos biliares tóxicos producen daño hepático induciendo apoptosis. La apoptosis de hepatocitos también ha sido demostrada en modelos animales que presentan colestasis. Los ácidos biliares inducen apoptosis de los hepatocitos mediante un mecanismo dependiente de Fas (Miyoshi y col., 1999).

Enfermedad de Wilson

El mecanismo de daño hepático en la enfermedad de Wilson incluye la generación de radicales libres por exceso de cobre con el subsecuente daño oxidativo en los hepatocitos. Células apoptóticas son frecuentemente detectables en cortes de hígado de pacientes con esta enfermedad, por lo que la apoptosis parece ser un elemento esencial que contribuye al daño. En particular, la señalización por Fas puede activarse por el estrés oxidativo generado por el exceso de cobre acumulado en los hepatocitos, induciendo la expresión de Fas y ligando Fas, promoviendo el mecanismo fratrícida también propuesto para la enfermedad hepática alcohólica (Strand y col., 1998).

Apoptosis y su relación con la fibrosis

La apoptosis de los hepatocitos y la fibrosis hepática son dos características importantes que se presentan en las diferentes enfermedades hepáticas crónicas. La apoptosis de los hepatocitos ocurre en fases agudas del daño hepático, mientras que la fibrosis es una respuesta tardía de las células estelares hepáticas. Sin embargo, se ha especulado la existencia de una relación entre la apoptosis de los hepatocitos y la fibrosis hepática (Canbay y col., 2004).

La apoptosis de los hepatocitos resulta en la generación de cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos son removidos de los tejidos mediante fagocitosis. El englobamiento de estos cuerpos es necesario para la protección de posible daño tisular generado por la liberación de contenido pro-inflamatorio. *In vitro*, macrófagos que han ingerido cuerpos apoptóticos inhiben la producción de citocinas pro-inflamatorias mediante un mecanismo que involucra la secreción de TGF- β . Del mismo modo, las células epiteliales y los fibroblastos han demostrado poder eliminar los cuerpos apoptóticos (Savill y Fadok, 2000).

Las células estelares hepáticas (CEH) se encuentran de forma adyacente a los hepatocitos y podrían fagocitar los cuerpos apoptóticos generados por hepatocitos en proceso de muerte. Más aún, si la generación del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) se incrementa en las CEH por la ingestión de estos cuerpos, como en los macrófagos, esta citocina promovería una respuesta profibrogénica en el hígado. Recientemente, se ha observado que CEH engloban cuerpos apoptóticos y la incubación con estos cuerpos estimula la expresión del ARNm de TGF- β 1 y de colágena (Gores y Yoon, 2002) Figura 2.

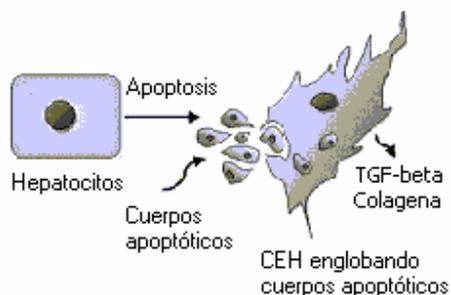


Figura 2. Relación de la apoptosis de hepatocitos con la fibrosis.

1.4 MECANISMOS MOLECULARES DE LA APOPTOSIS EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA (EHA)

Las formas más importantes de la enfermedad hepática alcohólica son: esteatosis, hepatitis alcohólica y cirrosis. La esteatosis se caracteriza por infiltración grasa, mientras que en la hepatitis alcohólica se observa necrosis y apoptosis de los hepatocitos, infiltración de leucocitos y fibrosis perisinusoidal-pericelular. En la cirrosis predomina la presencia de nódulos regenerativos separados por bandas de tejido cicatrizado (Lieber, 2000; Lefkowitz, 2001).

El metabolismo del etanol altera el estado redox-intracelular. El etanol se metaboliza predominantemente por dos vías, en ambas se produce una oxidación del etanol a acetaldehído. La primera involucra la oxidación del etanol a acetaldehído, por la deshidrogenasa alcohólica citosólica, y subsecuentemente a la producción acetato por la aldehído deshidrogenasa mitocondrial. Ambos pasos se acoplan a la reducción de NAD a NADH. La relación elevada NADH/NAD causa grandes efectos en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, lo que contribuye a la patogénesis del hígado graso (esteatosis), estado inicial de la enfermedad hepática alcohólica.

La segunda vía involucra al sistema oxidativo microsomal (MEOS). El componente principal de este sistema es el citocromo P4502E1 (CYP2E1), que oxida el alcohol a acetaldehído, con la oxidación de NADPH a NADP. Esta vía, en conjunto con el hierro libre, genera radicales libres reactivos que pueden llevar a estrés oxidativo.

El estrés oxidativo genera peroxidación de la membrana y de lipoproteínas y eventualmente necrosis y/o apoptosis. Adicionalmente, las moléculas reactivas producidas, son capaces de unirse covalentemente a proteínas y formar aductos. Los aductos que se han identificado en el hígado de pacientes con EHA incluyen proteínas unidas a acetaldehído, al radical hidroxietilo y a los productos aldehidos finales de la lipoperoxidación, malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE) (French, 2000; Lumeng y Crabb, 2001; Parola y Robino, 2001; Stewart y col., 2001).

EHA y apoptosis

La apoptosis juega un papel importante en el daño inducido por alcohol tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. En modelos de ratas alimentadas intragástricamente con alcohol, se observa mayor número de células apoptóticas y se ha observado que ratones expuestos crónicamente a vapores de etanol por inhalación muestran un aumento en la apoptosis, la cual es reversible al detener la exposición (Miñana y col., 2002).

Varios mecanismos han sido asociados con la apoptosis inducida por alcohol en hepatocitos, tales como el estrés oxidativo y los procesos mediados por receptores de muerte. Las especies reactivas de oxígeno pueden causar disfunción mitocondrial, provocando la liberación de factores pro-apoptóticos tales como el citocromo C (Yoon y Gores, 2002).

La señalización mediada por receptores de muerte también ha sido asociada con la apoptosis inducida por alcohol, especialmente por Fas y TNF- α . El receptor Fas se encuentra altamente expresado en hepatocitos de pacientes con hepatitis alcohólica comparada con controles. Más aún, niveles de Fas soluble y FasL se encuentran aumentados en pacientes con hepatitis alcohólica severa (Taieb y col., 1998).

Algunos otros factores parecen estar involucrados en la apoptosis relacionada con alcohol. El TGF β 1 es capaz de inducir apoptosis en hepatocitos en cultivo. El TGF- β 1 es producido por las células estelares hepáticas en la enfermedad hepática alcohólica y podría tener un impacto doble en la progresión de la enfermedad: promoviendo la fibrogénesis y matando hepatocitos por apoptosis (Schuster y Krieglstein, 2002).

In vitro, se ha observado apoptosis en la línea celular HepG2 transfectada con citocromo P-4502E1 humano (Wu y Cederbaum, 2001). En hepatocitos aislados de ratas Wistar, cultivados en la presencia de alcohol, la cantidad de DNA fragmentado y el número de hepatocitos apoptóticos se incrementa con el etanol (Higuchi y col., 2001).

El citocromo P4502E1 (CYP2E1) está involucrado en la generación de estrés oxidativo por alcohol. En algunos modelos de daño hepático inducido por alcohol, se presentan fuertes correlaciones entre los niveles de CYP2E1, lipoperoxidación y daño, mientras que los inhibidores del citocromo previenen parcialmente las lesiones (Chen y Cederbaum, 1998).

Mediante la utilización de líneas celulares como la HepG2 transfectada con este citocromo, se ha demostrado que la apoptosis inducida por alcohol es dependiente de CYP2E1 ya que la fragmentación del DNA, la activación de las caspasas 1 y 3 y los cambios morfológicos apoptóticos no se encuentran en células HepG2 que no expresan este citocromo; la apoptosis disminuye o se previene mediante la utilización de 4-metilpirazol, un inhibidor efectivo de la oxidación del etanol por CYP2E1; cuando las células son tratadas con trolox, agente antioxidante, no hay indicio de apoptosis (Wu y Cederbaum, 1999).

La toxicidad del alcohol se incrementa cuando los niveles de glutatión reducido (GSH) disminuyen por tratamiento con butionina sulfoximina (BSO), efecto que se previene con antioxidantes. La remoción del GSH de las células que expresan el citocromo resulta en activación de la caspasa 3 y apoptosis así como necrosis (Collel y col., 1998).

Así mismo, se ha reportado que el GSH participa de manera importante en la protección contra el estrés oxidativo producido por el CYP2E1 y que la mitocondria pudiera ser el "blanco" de las especies reactivas de oxígeno derivadas de este citocromo (Wu y Cederbaum, 2001).

Los eventos secuenciales que podrían llevar a la apoptosis podrían involucrar la oxidación del etanol por el citocromo, la producción de un estado pro-oxidativo y la activación de caspasas, llevando a los eventos finales de la apoptosis.

Regulación mitocondrial de la apoptosis inducida por alcohol en hepatocitos

Algunos estudios indican que en los hepatocitos de rata que han sido intoxicados con alcohol por poco tiempo se induce estrés oxidativo seguido por disfunción mitocondrial y apoptosis cuando son cultivados (Kurose y col., 1997).

Evidencia más reciente ha demostrado que la mitocondria participa de forma crítica en la apoptosis mediante la liberación de factores inductores, tales como el citocromo C. En muchos sistemas, la apoptosis se asocia con pérdida del potencial de membrana mitocondrial, que corresponde a un aumento en la permeabilidad de la membrana, referido como transición de permeabilidad mitocondrial (TPM) (Higuchi y col., 2001).

El tratamiento por periodos cortos (6 h) con etanol (50 mM) induce estrés oxidativo en la mitocondria, TPM, liberación de citocromo C y apoptosis. La ciclosporina A, que inhibe la formación del poro transitorio de permeabilidad (PTP), atenúa efectivamente los eventos mencionados anteriormente. Estas observaciones indican que la TPM es esencial para la apoptosis de los hepatocitos inducida por etanol (Higuchi y col., 2001). Más aún, en la apoptosis inducida por etanol no se observa activación de caspasa 8 o rompimiento de Bid. Debido a que la exposición aguda al etanol dispara un mecanismo independiente al de Bid/caspasa-8, por lo que podría inducir apoptosis mediante un mecanismo distinto al Fas/TNF- α en hepatocitos.

A pesar de que se ha enfatizado el papel de la TPM en la apoptosis inducida por etanol, cierta evidencia indica que el citocromo C es una molécula muy grande (15 kDa) para pasar a través del PTP, que sólo permite el paso de moléculas menores a 1.5 kDa. Por lo tanto, el mecanismo preciso mediante el cual el citocromo C sale de la mitocondria durante la apoptosis no se conoce.

Se han realizado estudios para evaluar el papel de la proteína Bax en la inducción de la liberación del citocromo C y apoptosis en hepatocitos expuestos a etanol. La proteína Bax es translocada del citosol a la mitocondria en un estadio temprano de apoptosis y dispara la liberación del citocromo C (Jurgensmeier y col., 1998). Se

ha propuesto que las proteínas Bax se oligomerizan para formar un canal en la membrana externa de mitocondria (Antonsson y col., 2001).

Otro mecanismo sugiere que Bax interactúa con el PTP para inducir la liberación del citocromo c (Shimizu et al., 1999). Hepatocitos expuestos a etanol 50 mM no muestran oligomerización de Bax. Sin embargo, Bax puede formar un complejo con el canal aniónico dependiente de voltaje, componente del PTP, lo que podría generar cambios conformacionales en el poro, haciéndolo lo suficientemente grande para permitir el paso del citocromo c desde la mitocondria (Cahill y col., 2002).

Efecto del etanol en la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria

Estudios recientes sugieren que la mitocondria puede ser una fuente importante de especies reactivas de oxígeno (ERO) en hepatocitos expuestos a etanol aguda o crónicamente. Algunas observaciones indican que la habilidad del etanol de incrementar la producción de ERO se asocia con su metabolismo y con la capacidad de alterar el sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria. Más aún, la exposición crónica al etanol ha mostrado causar efectos deletéreos en los sistemas antioxidantes, específicamente en la glutatión peroxidasa-1.

La modificación oxidativa y la inactivación de proteínas mitocondriales podría ser un mecanismo mediante el cual el etanol modifica la estructura y función de la mitocondria y contribuya a la patología observada en el hígado de personas alcohólicas (Cahill y col., 2002).

Bajo condiciones fisiológicas normales, la cadena de transporte de electrones mitocondrial es la mayor fuente de ERO en las células, debido a la posibilidad de que electrones no apareados se unan al oxígeno molecular mientras que son transportados por los complejos respiratorios. Existen dos sitios principales en la cadena respiratoria donde se ha propuesto generación de ERO: complejo NADH deshidrogenasa (complejo I) y el complejo ubiquinona/citocromo C reductasa (complejo III). Estos dos sitios pueden contener electrones no apareados, que

pueden ser donados al oxígeno molecular para formar el anión superóxido. Se ha propuesto que la habilidad del etanol de estimular las ERO mitocondriales se encuentra ligada a su metabolismo.

Cuando un individuo consume cantidades moderadas de etanol, la mayoría se metaboliza por la enzima alcohol deshidrogenasa hepática; este metabolismo resulta en la generación de acetaldehído y NADH. El acetaldehído es oxidado por la aldehído deshidrogenasa a acetato, resultando también en la producción de NADH. Por lo tanto, se presenta un aumento significativo en las concentraciones de NADH citosólico y mitocondrial, lo que estimula el flujo de equivalentes reducidos en la cadena transportadora de electrones.

Estudios realizados por Bailey y col. (2001), han demostrado que la mitocondria es una fuente significativa de ERO cuando los hepatocitos son incubados con etanol (1 a 10 mM). El metabolismo del etanol se requiere para el incremento de las ERO, ya que el pretratamiento con 4-metilpirazol, inhibidor de la alcohol deshidrogenasa, atenúa la inducción de niveles de ERO. Del mismo modo, la cianamida, inhibidor de la aldehído deshidrogenasa, también suprime el incremento de ERO por el etanol. Estas observaciones enfatizan que la producción de ERO en presencia de dosis agudas de etanol se relacionan con la generación de NADH.

Otros estudios han resaltado el efecto de la exposición crónica de alcohol en los mecanismos antioxidantes que protegen a los hepatocitos del daño oxidativo. Se ha sugerido que el incremento de ERO en presencia de etanol está ligado al decremento en la actividad de la glutatión peroxidasa-1. La alimentación crónica con etanol reduce significativamente la actividad de esta enzima entre un 30 y un 40% en mitocondria y citosol, respectivamente (Bailey y col., 2001).

Varias ERO son capaces de oxidar proteínas mediante el ataque a diferentes residuos de aminoácidos específicos generando grupos carbonilo (Berlett y Sadtman, 1997). El consumo crónico de etanol aumenta significativamente la concentración de carbonilos protéicos en el hígado (Bailey y col., 2001). El aumento de ERO relacionado al etanol puede inactivar proteínas mitocondriales, afectando su funcionalidad.

1.5 SEÑALIZACIÓN DEL TNF- α EN APOPTOSIS

El TNF- α es una citocina pleiotrópica que puede inducir tanto respuestas proliferativas como citotóxicas en diferentes tipos celulares y tejidos. La señalización intracelular mediada por TNF-R1 incluye señales tanto apoptóticas como de supervivencia. El TNF interactúa con dos receptores membranales, el receptor 1 para TNF (TNF-R1) y con el receptor 2 para TNF (TNF-R2). Ambos receptores son miembros de la superfamilia de receptores para TNF, sin embargo, sólo el TNF-R1 contiene un dominio de muerte en su parte intracelular y es capaz de inducir apoptosis.

El TNF-R1 se encuentra abundantemente expresado en células hepáticas, por lo que la muerte celular puede inducirse a través de este receptor. El acoplamiento del TNF-R1 con TNF- α permite que la proteína adaptadora asociada a TNFR (TRADD) se una al dominio de muerte del receptor. TRADD dirige varias moléculas de señalización hacia el receptor activado, tales como el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), el Factor-2 asociado a TNF (TRAF-2), la proteína interactiva-receptor (RIP) y la proteína asociada a RIP (RAIDD). FADD une y activa a la caspasa-8 y 10, provocando apoptosis de manera similar a la activada por Fas. RIP une tanto a RAIDD, que recluta a la caspasa-2, como a TRAF-2.

La asociación de RIP y TRAF-2 al receptor también puede activar una proteína cinasa inductora de NF- κ B (NIK), quien activa el complejo I κ B cinasa, provocando fosforilación de la proteína inhibidora de NF- κ B llamada I κ B α . I κ B α fosforilado se degrada vía ubiquitin-proteosoma, permitiendo que el NF- κ B se transloque al núcleo e inicie la transcripción de genes, la mayoría involucrados en vías de supervivencia. La inhibición del NF- κ B sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por TNF- α . La asociación de RIP y TRAF-2 puede también activar la cinasa c-Jun (JNK), llevando a la transcripción de genes que participan en vías apoptóticas (Fig 3).

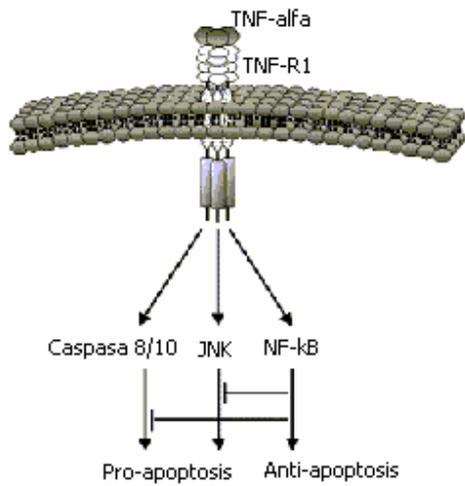


Figura 3. Señalización del TNF- α en apoptosis

La señalización por TNF- α es compleja y usualmente no induce apoptosis a menos de que las señales de supervivencia del NF- κ B se encuentren desacopladas (Liedtke y col., 2002).

1.6 INTERLEUCINA-10 (IL-10)

Generalidades

La IL-10 fue descrita originalmente en estudios sobre la naturaleza e identificación de una molécula en el sobrenadante de linfocitos Th2 con actividad inhibitoria de las funciones de células Th1. La IL-10 inhibía la expresión de citocinas por macrófagos y por células Th1, así como la presentación de antígenos.

La clonación de la IL-10 ha permitido una mejor caracterización de la citocina recombinante, mostrando múltiples actividades además de las ya mencionadas, que incluyen estimulación de la proliferación de mastocitos y células B, secreción de anticuerpos y expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II. Estudios *in vivo* han mostrado una efectiva protección de la endotoxemia letal en ratones a los que se les administró IL-10 recombinante. Los ratones “knockout” para IL-10 (IL-10^{-/-}) han sido utilizados para evaluar el papel *in vivo* de esta citocina. Estos ratones IL-10^{-/-} desarrollan enterocolitis y cáncer de colon de forma espontánea con producción aberrante de citocinas y respuestas acentuadas de tipo Th1. Del mismo modo, se ha observado que estos ratones muestran una baja supervivencia en transplantes de corazón debido a respuestas inflamatorias incrementadas, mientras que transplantes de hígado transfectados con un vector viral para expresión de IL-10 muestran una aloreactividad suprimida (Tsukamoto, 2000).

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria potente, producida localmente en el hígado que tiene efectos moduladores sobre la fibrogénesis hepática (Louis y col., 1998). *In vitro*, disminuye la producción de colágena tipo I incrementando la expresión de metaloproteinasa-I (MMP-1) o colagenasa intersticial y la metaloproteinasa-3 (MMP-3) o estromelisina-1 (Reitamo y col., 1994).

En contraste, IL-10 exógena inhibe la síntesis de MMP-9 y bloquea la expresión de MMP-1 estimulada por LPS, incrementando la producción de inhibidores de la metaloproteinas (TIMP-1) en macrófagos humanos. Wang y col. (1998) han

reportado que las células estelares hepáticas activadas (HSC) tanto *in vivo* como *in vitro* expresan IL-10 y que los efectos autócrinos de esta citocina incluyen la inhibición de la síntesis de colágena.

Louis y col. (1998) reportaron que en un modelo de daño hepático agudo que involucra la producción de radicales libres, la IL-10 endógenamente producida afecta marginalmente la necrosis de los hepatocitos aunque controla la respuesta inflamatoria aguda inducida por CCl₄. Así mismo, limita la proliferación de los hepatocitos y modula la fibrosis hepática. Se ha reportado que la expresión del ARNm de IL-10 está disminuida en muestras hepáticas de pacientes con cirrosis y hepatitis C crónica (Napoli y col., 1996) y en ratas que presentan daño necroinflamatorio (Nanji y col., 1999).

Nelson y col. (2000) reportaron que la IL-10 normaliza los niveles de Alanintransferasa (ALT) en suero, mejora la histología hepática y reduce la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis C crónica, que previamente no habían respondido a tratamiento con interferón. Así mismo, los niveles elevados en suero de IL-10 podrían ser predictivos de un mejor pronóstico en pacientes con daño hepático (Yumoto y col., 2002).

Thompson y col. (1998), demostraron que no hubo diferencia entre ratones IL-10^{-/-} y controles normales sometidos a tratamiento crónico con alcohol para desarrollar fibrosis. Aunque la fibrosis fue más severa en los ratones sin el gen a las 10 semanas, se sugirió un efecto promotor de la deficiencia de IL-10 en la fibrogénesis.

De acuerdo a los hallazgos encontrados, el papel de la IL-10 en la inflamación crónica y en la fibrogénesis es importante y complejo. Esta complejidad puede reflejar interacciones con otros factores tales como citocinas (TGF- β e INF- γ). Por ejemplo, los efectos antiinflamatorios de la IL-10 involucran la supresión de citocinas Th1, impidiendo la fibrogénesis hepática si la inflamación la desencadena. Sin embargo, las citocinas Th1 incluyen al INF- γ , y su supresión puede promover directamente la fibrogénesis ya que inhibe la activación de las células estelares hepáticas *in vitro* y la fibrosis hepática *in vivo*.

La IL-10 muestra una naturaleza pleiotrópica. Los animales deficientes en IL-10 son más susceptibles a la fibrosis inducida por CCl₄, sugiriendo que la administración de IL-10 podría ser antifibrogénica. Sin embargo, este efecto profibrogénico de la deficiencia de IL-10 no se reproduce en el modelo de esquistosomiasis y debe ser probado en diversos modelos de fibrosis hepática.

IL-10 y apoptosis

La IL-10 induce apoptosis en mastocitos derivados de médula ósea, observándose disminución en la expresión de *bcl-X_L* y *bcl-2*. (Yeatman y col., 2000).

La IL-10 protege directamente a células progenitoras mieloides de la apoptosis. Esta actividad se inhibe significativamente con anticuerpos contra el receptor para IL-10 (Zhou y col., 2001).

Por otra parte, estudios realizados por Schmidt y col. (2000), muestran que la IL-10 induce apoptosis en monocitos de sangre periférica de forma dosis-tiempo dependiente, observándose una regulación positiva de CD95. Anticuerpos anti-ligando CD95 inhiben la apoptosis inducida por esta citocina.

1.7 FACTOR NUCLEAR- κ B (NF- κ B)

Las células ajustan su patrón de expresión genética para acoplarse al microambiente siempre cambiante. Esta regulación adaptativa ocurre principalmente a nivel de la transcripción y es controlada por factores de transcripción. En el núcleo, estos factores se unen selectivamente a los sitios reguladores de los genes, activando o reprimiendo su transcripción. El factor nuclear de transcripción NF- κ B participa de forma importante en la regulación de respuestas adaptativas a patógenos y al estrés (Barnes y Karin, 1997).

NF- κ B es el nombre colectivo para factores de transcripción diméricos incluidos en la familia Rel de proteínas que se unen al DNA y reconocen una secuencia común: 5'-GGG(A/G)NN(T/C)(T/C)CC-3', donde N es cualquier base. Se conocen cinco miembros de la familia Rel en mamíferos: RelA (p56), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50) y NF- κ B2. Cualquier homo y heterodímero se considera NF- κ B, pero el que más comúnmente se localiza en células activadas es el heterodímero RelA/NF- κ B1 (p65/p50), referido como el NF- κ B clásico. Todas las proteínas Rel contienen un dominio homólogo responsable de la formación de dímeros, translocación nuclear, reconocimiento de la secuencia específica de DNA e interacción con proteínas I κ B (Barnes y Karin, 1997).

La activación de NF- κ B está controlada por su interacción con una familia de proteínas inhibitorias conocidas como I κ B. La familia I κ B incluye I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , p100, p102 y Bcl-3. Todas las I κ Bs comparten tres mismas formas estructurales: Un dominio regulatorio N-terminal, responsable para una proteólisis I κ B, un dominio compuesto de seis o siete ankirinas (ANK) para la interacción con proteínas Rel y un dominio C-terminal.

En células no estimuladas, el NF- κ B se encuentra en el citoplasma como un complejo inactivo NF- κ B-I κ B. La unión de I κ B impide el reconocimiento de la señal de localización nuclear NF- κ B por la maquinaria de importación nuclear, reteniendo al NF- κ B en el citoplasma. La estimulación de las células libera al NF- κ B "activo", que es libre para entrar al núcleo y activar la transcripción. Con pocas

excepciones, la liberación de NF- κ B está mediada por la degradación de I κ B (Fig 3). La degradación inducible de I κ B ocurre a través de pasos consecutivos de fosforilación, ubiquitinación y degradación proteasomal. El procesamiento de I κ B se encuentra controlado por tres complejos multi-proteicos: I κ B cinasa (IKK) o “señalsoma”, I κ B ubiquitina ligasa y el proteosoma 26S (Magnani y col., 2000).

Mientras que la I κ B ubiquitina ligasa y el proteosoma 26S son constitutivamente activos, la actividad de IKK es inducible por estimulación. Varios estímulos, incluyendo citocinas inflamatorias, mitógenos, proteínas virales y de estrés, activan a la IKK, induciendo la fosforilación de dos residuos críticos de serina de I κ B. Esta fosforilación de I κ B dispara la rápida ubiquitinación y la degradación proteosomal.

Para muchos estímulos, incluyendo la interleucina 1 (IL-1) y el TNF- α , la degradación de I κ B y la translocación de NF- κ B al núcleo son necesarias pero no suficientes para la inducción de la transcripción dependiente de este factor. La habilidad del NF- κ B para iniciar la transcripción depende de interacciones con diferentes co-activadores transcripcionales. A pesar de ser regulados independientemente, las vías de control de la degradación de I κ B y la función de transcripción de NF- κ B actúan sinérgicamente en la activación de la transcripción mediada por NF- κ B (Wooten 1999).

La vía de señalización del NF- κ B tiene varios mecanismos autorregulatorios que limitan la duración e intensidad de la activación del factor. Uno de estos mecanismos se basa en la rápida inducción de I κ B por el NF- κ B activado. Esto se debe a que el promotor de I κ B contiene sitios que reconocen al NF- κ B, por lo que este factor induce la expresión de su propio inhibidor. La nueva proteína sintetizada I κ B entra al núcleo donde disocia al NF- κ B del DNA y lo transporta al citoplasma. Otro mecanismo, actúa sobre IKK. La IKK β activada se autofosforila en su región inhibitoria, limitando la duración de la activación.

El NF- κ B puede activarse por gran variedad de estímulos patogénicos, que incluyen productos bacterianos, proteínas virales, citocinas, factores de crecimiento, radiación, isquemia/reperfusión y estrés oxidativo. La activación del NF- κ B no requiere de síntesis de proteínas *de novo* y ocurre a pocos minutos de la estimulación. El NF- κ B activado induce la expresión de mediadores de inflamación y respuesta inmune. Se han identificado más de 150 genes activados por NF- κ B, entre los que se encuentran citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular y factores de crecimiento. Basado en esto, el NF- κ B se considera un regulador central de respuestas celulares a patógenos y a estrés (Makarov, 2000).

Se piensa que los factores de transcripción AP-1 (proteína activadora 1) y NF- κ B, que son sensibles a la producción de ERO y a las condiciones oxidantes, participan de manera importante en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica mediante la regulación positiva de citocinas pro-inflamatorias.

En un estudio de Roman y col. (1999) se demostró que en células HepG2 transfectadas con CYP2E1, el etanol disminuyó las reservas de GSH intracelular tanto en el citosol como en la mitocondria, reflejando la inducción de estrés oxidativo. Así mismo, el etanol activa al NF- κ B y al AP-1 en las transfectadas, y por el contrario el etanol no activa estos factores en células HepG2 sin el CYP2E1.

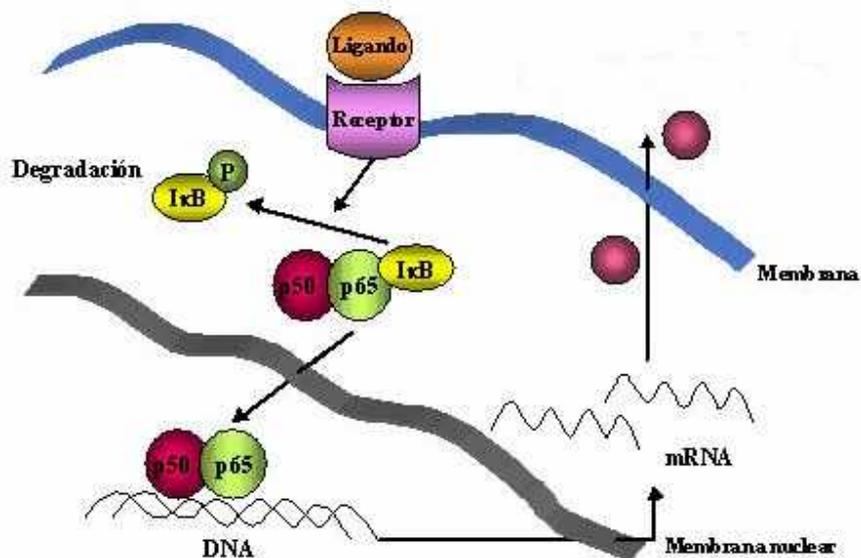


Figura 4. Activación del NF- κ B

2. OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

-Evaluar el efecto de la Interleucina-10 en la apoptosis de hepatocitos.

OBJETIVOS PARTICULARES

-Evaluar el efecto de la Interleucina-10 en la apoptosis inducida temprana y tardía.

-Evaluar el efecto de la Interleucina-10 en la activación de caspasa-3, en la disrupción del potencial de membrana mitocondrial y en la expresión de los genes bax y bcl-2 en la apoptosis inducida de hepatocitos.

-Estudiar la relación de la Interleucina-10 y la activación del NF- κ B en hepatocitos.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, la cirrosis se considera la quinta causa de muerte, siendo un problema grave de salud pública. A la fecha no existe una terapia adecuada para el control de esta enfermedad. Varios agentes pueden ser causantes de cirrosis hepática, tales como el alcohol o el virus de la hepatitis C, entre otros. La apoptosis de los hepatocitos es un evento presente en la gran diversidad de enfermedades hepáticas, tanto agudas como crónicas y se ha postulado que su modulación pueda ser una posibilidad terapéutica. Más aún, si se considera la posible relación entre la apoptosis de los hepatocitos y la fibrosis hepática, la inhibición de la apoptosis podría funcionar como estrategia antifibrótica. La IL-10 parece tener efectos antifibróticos en ciertos modelos de daño hepático y actuar como antiapoptótica en algunos tipos celulares, aunque no se han realizado estudios sobre su efecto en la apoptosis de hepatocitos. Estudios previos, muestran que la IL-10 es capaz de activar al factor nuclear- κ B, lo que llevaría a la expresión de genes de supervivencia de la célula. Por lo tanto, es importante describir el efecto de esta citocina en la apoptosis de hepatocitos, y así, contribuir a comprender el desarrollo de la enfermedad hepática, con la posibilidad de encontrar terapias eficientes que eviten su progresión.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN HEPATOCITOS EN CULTIVO PRIMARIO

Los hepatocitos fueron sembrados a una densidad de 2.5×10^4 cel/cm². Después de 12 h, el medio de cultivo fue cambiado y al nuevo se le adicionó:

-Sulfasalazina 0.5 mM (inhibidor del NF- κ B) durante 1 h y TNF- α 30 ng/ml (R & D Systems) por 12 h.

-Etanol 50 mM durante 12 h.

-Etanol 50 mM durante 12 h + TNF- α 30 ng/ml durante 4 h.

-BSO (Butionina-sulfoximina, sustancia que inhibe la síntesis de glutatión citosólico) 5 mM durante 12 h.

-BSO 2 mM durante 6 h y posteriormente se adicionó al medio etanol 50 mM durante 12 h.

Al final de la exposición, las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS), y se tripsinizaron para determinación de apoptosis temprana y tardía, caspasa-3 activa y disrupción de membrana mitocondrial. Para la determinación de la expresión de bax y bcl-2, las células se lavaron dos veces con PBS y fueron raspadas para aislamiento de ARN total.

4.2 EFECTO DE LA IL-10 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA

Se realizó una curva de tiempo con IL-10 (10 ng/ml) y TNF- α (30 ng/ml), previo tratamiento con sulfasalazina 0.05 mM, por 12 h.

Posteriormente se realizó una curva de dosis-respuesta con pretratamiento de IL-10 durante 6 h y apoptosis inducida por TNF- α (30 ng/ml) e inhibidor de NF- κ B por 12 h.

Para evaluar el efecto de la IL-10, los hepatocitos fueron sembrados a una densidad de 2.5×10^4 cel/cm². Después de 12 h, el medio de cultivo fue cambiado y al nuevo se le adicionó IL-10 durante 6 h a una concentración de 5 ng/ml previo a la exposición con TNF- α 30 ng/ml y sulfasalazina por 12 h, etanol 50 mM durante 12 h o BSO 2 mM 6 h y etanol 50 mM durante 12 h.

Al final de la exposición, las células se lavaron dos veces con PBS, y se tripsinizaron para determinación de apoptosis temprana y tardía.

Para la determinación de la caspasa-3 activa, se realizaron curvas de tiempo de exposición a los inductores de apoptosis y posteriormente los hepatocitos se pretrataron con IL-10 (5 ng/ml) previo a 3 h de tratamiento con TNF- α , 2 h con etanol 50 mM, o BSO 2 mM 6 h y etanol 50 mM durante 2 h.

Al final de la exposición, las células se lavaron dos veces con PBS, y se recolectaron para la determinación de caspasa-3 activa.

En cuanto a la determinación de la disrupción de potencial de membrana mitocondrial, los hepatocitos se pretrataron durante 6 h con IL-10 (5 ng/ml) a las 2 h de tratamiento con TNF- α , etanol y BSO/etanol a las concentraciones antes mencionadas. Al final de la exposición, las células se lavaron dos veces con PBS, y se tripsinizaron para determinación de la disrupción de potencial.

Para la determinación de bax y bcl-2, los hepatocitos se pretrataron durante 6 h con IL-10 (5 ng/ml) a una hora de tratamiento con TNF- α , etanol y BSO/etanol a las concentraciones antes mencionadas. Al final de la exposición, las células se lavaron dos veces con PBS, y se recolectaron para la extracción del ARN total.

4.3 ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR- κ B

Los hepatocitos fueron sembrados a una densidad de 2.5×10^4 cel/cm². Después de 12 h, el medio de cultivo fue cambiado y al nuevo se le adicionó IL-10 (10ng/ml), a diferentes intervalos de tiempo desde 1 hasta 4 h. Esta concentración se eligió por estudios previos en células HepG2. Al final de la exposición, las células se lavaron dos veces con PBS, y se recolectaron para la obtención de extractos nucleares, para realizar el ensayo de electromovilidad EMSA y para la obtención de extractos celulares para el Western Blot de I κ B.

4.4 EFECTO DE LA IL-10 EN LA APOPTOSIS DE CÉLULAS HepG2

Las células HepG2 se sembraron a una densidad de 2.5×10^4 cel/cm². Todas las células se sembraron al mismo tiempo. Después de 24 h, el medio de cultivo se cambió por uno que contenía etanol (EtOH) 50 mM durante 12 h. Por otra parte, las células fueron tratadas con cicloheximida (CHX), inhibidor de síntesis de proteínas, 40 μ M y TNF- α 30 ng/ml por 12 h. Para evaluar el papel de la IL-10 (10 ng/ml), la citocina fue administrada 6 h antes de los tratamientos. Al final de la exposición, las células se lavaron dos veces con PBS, y se tripsinizaron para realizar las determinaciones de apoptosis.

5. MÉTODOS

5.1 AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

Los hepatocitos se aislaron de ratas macho Wistar (200-250 g) mediante perfusión con colagenasa como se ha descrito previamente (Viña y col, 1978). Brevemente, las ratas se anestesiaron con éter y se les abrió la cavidad abdominal. Se localizó la vena cava y se canuló con un tubo de poliestireno para pasar solución Krebs-Ringer y limpiar el hígado de eritrocitos. Se adicionaron 13 mg de colagenasa tipo II (Gibco 276 U/mg) a la solución y se recirculó por medio de una bomba de perfusión durante 15 min. Una vez digerido el hígado, las células se obtuvieron mediante agitación mecánica en solución Krebs-Ringer, se filtraron a través de una malla de 250 micras, se lavaron con la misma solución y centrifugaron a 1700 rpm durante 1 minuto.

La viabilidad celular se evaluó con azul de tripano, rutinariamente se obtuvo una viabilidad del 90-95%. Los hepatocitos de rata se cultivaron en medio Dulbecco (Gibco) adicionado con 20 mU/ml de insulina, 10% de suero fetal de bovino (Hyclone), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycinina (100 mg/ml). Después de dos h (tiempo necesario para que los hepatocitos se pegaran a la caja de cultivo), las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para remover células muertas y el desperdicio celular. Las células se dejaron reposar por 12 h, y posteriormente se añadieron los tratamientos como se indica en el diseño experimental.

5.2 CULTIVO CELULAR

La línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection, Maryland USA) en el pasaje 79. Todas las células utilizadas en este trabajo se encontraban entre el pasaje 90 y el 120. Las células HepG2 se cultivaron rutinariamente en medio Williams E, suplementado con 10% de suero fetal de bovino, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycinina (100 mg/ml).

Las células se sembraron en botellas para cultivo a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ /95% aire. El medio de cultivo fue reemplazado dos veces por semana y las células fueron tripsinizadas y resembradas a una relación 1:3 una vez por semana.

5.3 DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS TEMPRANA (UNIÓN A ANEXINA)

Se utilizó el ensayo comercial Annexin V-FITC de R & D Systems.

Principio de la técnica: La anexina conjugada a FITC facilita la rápida detección fluorométrica de células apoptóticas. La anexina es una proteína anticoagulante que se une preferentemente a fosfolípidos cargados negativamente. En la fase temprana de la apoptosis, ocurre una disrupción del arreglo de los fosfolípidos de la membrana plasmática, que lleva a la exposición de fosfatidilserina en la cara externa. Este evento es importante, ya que de esta forma los macrófagos reconocen a las células apoptóticas. La unión entre la anexina y la fosfatidilserina es dependiente de calcio y ocurre con una constante de disociación de aproximadamente 5×10^{-10} M.

Técnica: Las células (1×10^6) se lavaron con PBS y resuspendieron en 100 µl de la mezcla de reacción Anexina V (10 µl de buffer de unión, 10 µl de yoduro de propidio, 1 µl de Anexina V-FITC y agua 79 µl). El yoduro de propidio permitió diferenciar entre las células apoptóticas y las necróticas. Se generaron controles que contenían sólo yoduro de propidio o anexina. Las células se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

5.4 DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS TARDÍA (MARCAJE DE FRAGMENTOS DE DNA CON LA TÉCNICA DE TUNEL)

Principio de la técnica: Este ensayo está basado en la visualización de nucleótidos biotinilados incorporados a los residuos terminales 3'-hidroxilo de los fragmentos de DNA generados.

Primeramente, las células son fijadas para prevenir la pérdida de fragmentos de DNA de bajo peso molecular. Para que el DNA sea accesible a la enzima marcadora, las membranas celulares se permeabilizan con un reactivo denominado cionina. Paso siguiente, la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) adiciona los nucleótidos biotinilados a los extremos 3' de los fragmentos de DNA. Posteriormente la estreptoavidina conjugada con fluoresceína (FITC) se une específicamente a los fragmentos de DNA biotinilados y puede detectarse por citometría de flujo.

Técnica: Las células (1×10^6) se incubaron en una solución de formaldehído al 3.7% durante 10 min. Posteriormente, se lavaron con PBS y se les adicionó 100 μ l de cionina, incubándose toda la noche en frío. Las células se lavaron con el amortiguador de marcaje y para generar un control positivo, se incubaron durante 30 min a 37°C con una TACS-nucleasa. Se adicionó la mezcla de reacción de marcaje, compuesta de nucleótidos biotinilados, la enzima transferasa de deoxinucleótidos terminales (TdT) y Mn^{2+} . Se generó un control negativo al que no se le adicionó TdT. Las células se incubaron durante 1 hora a 37°C y la reacción se detuvo con 1 ml de solución de paro.

Se adicionaron 25 μ l de la solución de Estreptoavidina-FITC y se incubó en la oscuridad durante 10 min. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 0.5 mL de esta solución. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo.

5.5 DETERMINACIÓN DE CASPASA-3 ACTIVA

La caspasa-3 activa se midió utilizando un inmunoensayo cuantitativo (active caspase-3 ELISA R&D Systems).

Principio de la técnica: La caspasa-3 es activada proteolíticamente por otras caspasas. La ruptura del zimógeno de caspasa-3 genera una pro-región, una subunidad larga y una pequeña. Este ensayo utiliza un inhibidor biotinilado para la caspasa que modifica covalentemente la subunidad larga. El inhibidor se adiciona directamente al medio de cultivo y entra a las células apoptóticas formando una unión tio-éter estable con la cisteína en el sitio activo. El inhibidor no modifica covalentemente a la caspasa-3 inactiva, que es la base para la discriminación entre la caspasa activa y la inactiva. Para la detección de la caspasa-3 se utiliza un anticuerpo monoclonal adherido a la microplaca. Este anticuerpo captura tanto al zimógeno de caspasa-3 como a la subunidad larga. Al adicionarse HRP (peroxidasa de rábano)-estreptoavidina, ésta se une a la biotina del inhibidor unido a la subunidad larga de la caspasa-3. Debido a que el zimógeno no fue modificado por el inhibidor biotinilado, no es detectado por la estreptoavidina. Después de lavarse la estreptoavidina-HRP no unida, se adiciona una solución sustrato. La reacción enzimática genera un producto azul que se torna amarillo cuando se adiciona la solución de paro. La intensidad del color se encuentra en proporción con la cantidad de caspasa-3 activa.

Técnica: Después de la inducción de apoptosis, se adicionó a las células 2 μ l del inhibidor biotinilado por ml de medio de cultivo y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, las células fueron raspadas de la caja de cultivo y se les adicionó la solución de extracción con inhibidores de proteasas, dejando reposar toda la noche a 4° C. Se adicionaron 100 μ l de la muestra por pozo de la placa y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados y se les adicionó 100 μ l de conjugado, dejando incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente los pozos se lavaron y se les adicionó 100 μ l de solución sustrato y se incubaron durante 30

min en oscuridad. Se agregó 100 µl de solución de paro y la placa fue leída a densidad óptica de 450 nm.

5.6 DETERMINACIÓN DE LA DISRUPCIÓN DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Se utilizó el ensayo comercial (R&D) denominado DePsipher, el cual es un catión lipofílico que puede ser utilizado como marcador de la actividad mitocondrial.

Principio de la técnica: DePsipher tiene la propiedad de agregarse a través de la polarización de la membrana formando un compuesto fluorescente rojo-naranja. Si el potencial se encuentra alterado, el colorante no puede entrar al espacio transmembranal y permanece o se revierte a su forma monomérica verde. La fluorescencia puede observarse con un microscopio o analizarse mediante citometría de flujo.

Técnica: Se adicionó a 1×10^6 células, 1 ml de solución DePsipher (1 µl de reactivo DePsipher con 1 ml de amortiguador de reacción) y se dejaron incubando a 37°C durante 20 min. Se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml de la misma solución. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo.

5.7 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE LOS EXTRACTOS CELULARES

La extracción del ARN total de las células, se realizó con el reactivo de Trizol. Se retiró el medio de las botellas de cultivo y las células se lavaron con PBS. Se adicionó 1ml de Trizol (Gibco) a las cajas para romper las células. El lisado celular fue raspado con un gendarme y se homogenizó varias veces. Se dejó reposar el homogenado durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 seg, dejando reposar por 5 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 15 min a 4°C y se retiró la fase acuosa para agregar 0.5 ml de isopropanol. Se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó 12000 rpm por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y al botón celular obtenido se le agregó 1ml de etanol al 75%. Se

agitó vigorosamente con vortex y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el pellet se secó al vacío, para disolverlo en agua-DEPC.

5.8 RT-PCR

EL RT-PCR se realizó usando un ensayo comercial (GeneAmp, Perkin Elmer). Para la transcripción reversa (RT) se tomaron 1.5 µg/ml de ARN total y se le agregó 2 µl de MgCl₂ 25 mM; 1 µl de cada dNTP's a una concentración de 10 mM; 0.5 µl de inhibidor de ARNasa (10 U/µl), 0.5 µL de oligo d(T)₁₆ 5 nmoles; 0.5 µl de transcriptasa reversa a una concentración de 50 U/µL y 1 µL de un buffer para PCR 10X. La mezcla se llevó a reacción en un termociclador (Perkin Elmer 480) y fue sometida a 37°C por 60 min seguido de 5 min a 95°C.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando el ensayo comercial anteriormente mencionado. A 3 µl de ADN complementario (ADNc) que se obtuvo en la reacción de RT, se le agregaron 2 µl de MgCl₂ 25 mM; 4µl de Buffer PCR 10X; 31.75µl de agua estéril; 0.25 µl de DNA polimerasa (AmpliTaq DNA polimerase, Perkin Elmer) a una concentración de 5 U/µl y 2.5 µl de los oligonucleótidos específicos para bax (sentido 5'-GGATGCGTCCACCAAGAAGC-3' y antisentido 5'-CACCCTGGTCTTGGATCCAG-3') o Bcl2. La mezcla se llevó a reacción al termociclador con las condiciones específicas para estos genes.

5.9 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS NUCLEARES

Los extractos nucleares se prepararon según la técnica reportada por Shreiber y col. (1989). 3X10⁶ células con tratamiento se resuspendieron e incubaron a 4°C por 15 min en 800 µl de un buffer A que contenía: 10mM de HEPES, 10 mM de KCl, 0.1 mM de EDTA, 0.1 mM de EGTA, 1 mM de Ditioneitol (DTT) y 0.5 mM de Fluoruro de Fenil metil sulfonilo (PMSF) a un pH de 7.9, pasado este tiempo se agregaron 50 µl de una solución al 10% de Igepal CA-630 en buffer A. Se agitó vigorosamente por 15 seg y se centrifugó inmediatamente por 30 seg a 4°C.

El precipitado de núcleos se resuspendió y fue incubado por 15 min a 4°C, con agitación continua, en un buffer C, que contenía: 20mM de HEPES, 0.4 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT y 1 mM de PMSF. Finalmente el extracto nuclear se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm a 4°C. El sobrenadante, que contenía la proteína nuclear, se dividió en varios tubos y se guardó a -80°C.

5.10 ENSAYO DE ELECTROMOVILIDAD

Cinco µg de extracto nuclear fueron incubados durante 15 min en hielo en un buffer que contenía 2 µl de poli (dl-dC), 50 mM de TRIS-HCl pH 7.5, 200 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 5 mM de β-mercaptoetanol y 20% de glicerol. Pasado este tiempo se adicionaron 2 µl de ³²P-oligonucleótido del NFκB. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 15 min. Se añadieron 2 µl de azul de bromofenol al 0.1 % y la muestra se cargó en un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 6% y se corrió a 150 V por 90 min. Después de este tiempo el gel se retiró de los cristales, se secó y se colocó en un cassette junto con una película a -80°C por 24 h. La imagen del gel se observó en un Phosphor imager, usando el software Quantity one (Bio-Rad).

5.11 WESTERN BLOT

El Western blot se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Simon y col. (1998). Brevemente, 5×10^6 células se resuspendieron en buffer de lisis con inhibidores de proteasas. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 min a 4°C. Del sobrenadante recuperado se cuantificó la proteína por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Se corrió la proteína en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% a 30 V por 12 h. La proteína total se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). La membrana fue bloqueada con TBS-Tween 20-leche 5% por 1 h, después se lavó con TBS-Tween 20 y se le agregó el anticuerpo primario monoclonal de ratón contra IκB-α (Santa Cruz, Biotechnology, INC). Se lavó con TBS-Tween 20 y se le agregó el anticuerpo secundario (Anti-mouse IgG, cabra) acoplado a peroxidasa por 1 h. Finalmente la membrana se

lavó con TBS y se reveló con el Kit SuperSignal[®] West Pico Substrate (Pierce). Las bandas se cuantificaron por densitometría.

5.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se reportan como medias \pm E.S de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Se utilizó el paquete SPSS versión 8 para determinar la significancia estadística entre los datos. La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de ANOVA. La prueba de Tukey se utilizó para comparaciones múltiples. Una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS

6.1 INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN HEPATOCITOS EN CULTIVO PRIMARIO

La exposición de los hepatocitos en cultivo primario a TNF- α y sulfasalazina indujo apoptosis temprana en un 24% respecto al control. Del mismo modo, el tratamiento con etanol provocó un 19% de células en apoptosis temprana, mientras que el tratamiento con TNF- α posterior a la exposición con etanol no modificó el valor de apoptosis inducida (Fig. 1).

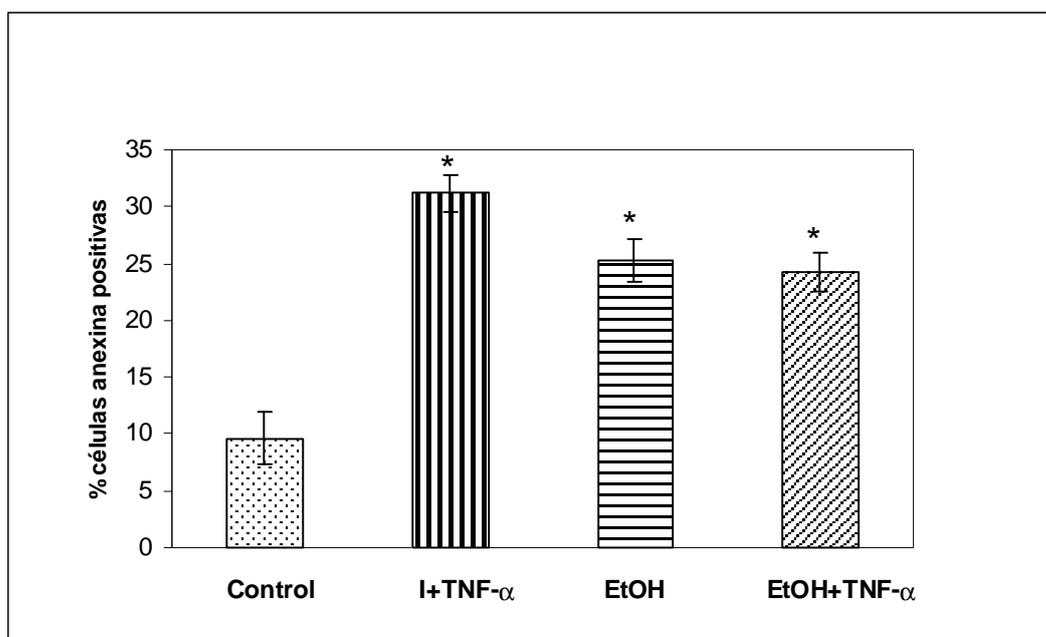


Figura 1. Apoptosis temprana de hepatocitos expuestos a diferentes tratamientos. Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF- α /inhibidor de NF- κ B, etanol (EtOH) y EtOH+ TNF- α como se describe en el diseño experimental. La unión a anexina-V se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

El tratamiento de los hepatocitos con BSO indujo una apoptosis temprana del 12% respecto al control, mientras que al exponer los hepatocitos a BSO y además etanol, la apoptosis se incrementó al doble (Fig. 2), por lo tanto para los demás experimentos se eligió el tratamiento con BSO/etanol.

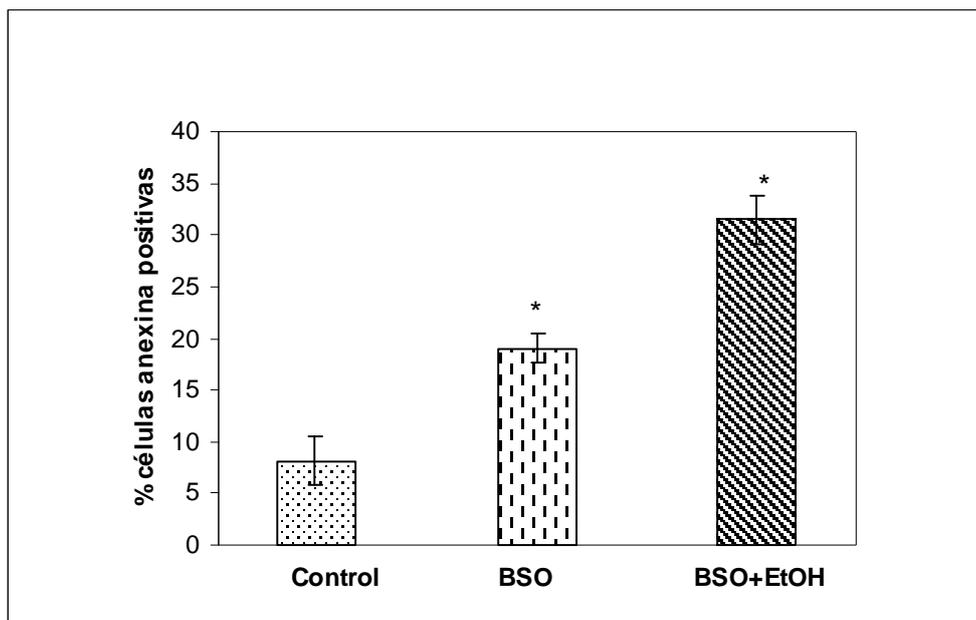


Figura 2. Efecto de la disminución de glutatión en la apoptosis temprana de hepatocitos. Hepatocitos de rata fueron tratados con BSO 2 mM durante 6 h. Un grupo de hepatocitos fue tratado además con EtOH 50 mM. La apoptosis se determinó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

También se determinó apoptosis tardía (Tunel) con los mismos tratamientos encontrándose que el TNF- α y sulfasalazina indujeron apoptosis en 15% de las células, el etanol en un 17% y el BSO/etanol en un 19% respecto al control (Fig. 3).

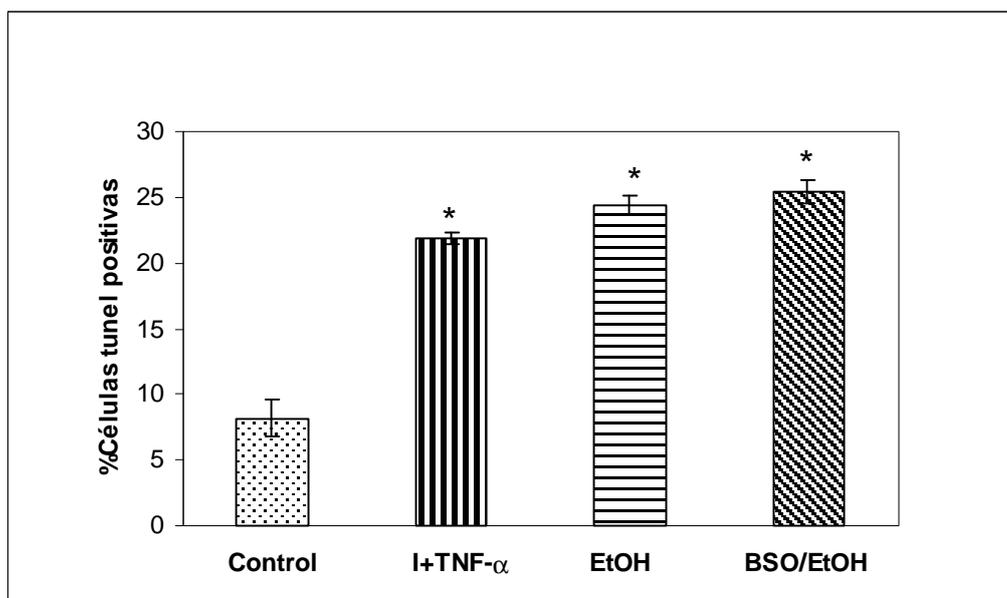


Figura 3. Apoptosis tardía de hepatocitos expuestos a diferentes tratamientos. Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF- α /inhibidor de NF- κ B, EtOH y BSO/EtOH como se describe en el diseño experimental. El marcaje con TUNEL se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

2. EFECTO DE LA IL-10 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR TNF- α

Curvas tiempo y dosis-respuesta de IL-10

Con el fin de evaluar si el pretratamiento con IL-10 tenía algún efecto en la apoptosis, se realizó una curva de tiempo con IL-10 (10 ng/ml) y TNF- α (30 ng/ml), previo tratamiento con sulfasalazina, durante 12 h. Se encontró que la mayor diferencia en la apoptosis temprana ocurrió a las 6 h de pretratamiento con la IL-10 (Fig. 4).

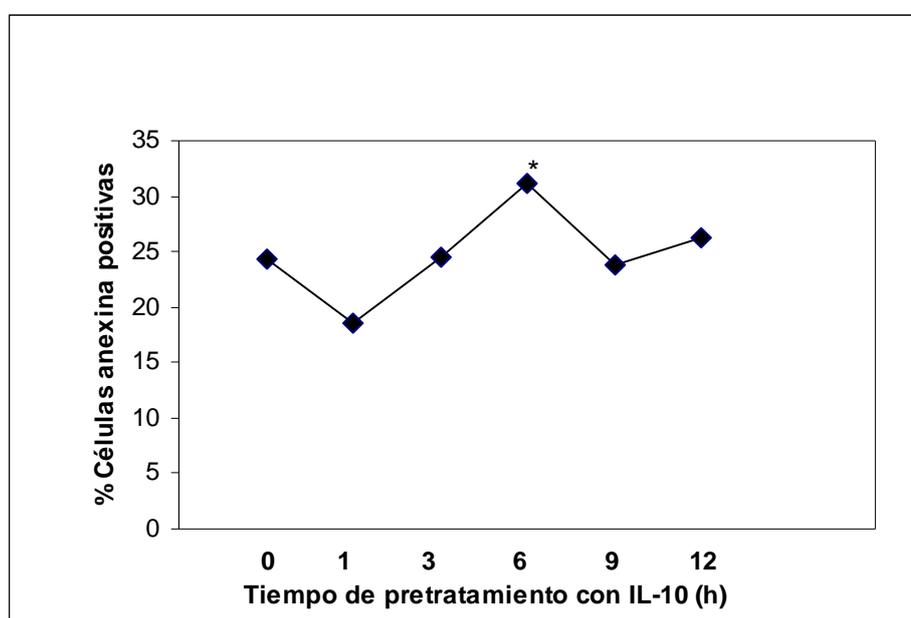


Figura 4. Curva de tiempo-respuesta de hepatocitos expuestos a IL-10 y TNF- α . Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF- α (30 ng/ml)/sulfasalazina por 12 h y pretratados con IL-10 (10 ng/ml) a diferentes intervalos de tiempo. La unión a anexina-V se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

Posteriormente se realizó una curva de dosis-respuesta con pretratamiento de IL-10 durante 6 h y apoptosis inducida por TNF- α (30 ng/ml) e inhibidor de NF-kB por 12 h. Se encontró diferencia significativa con una concentración de 5 ng/ml de IL-10 (Fig. 5).

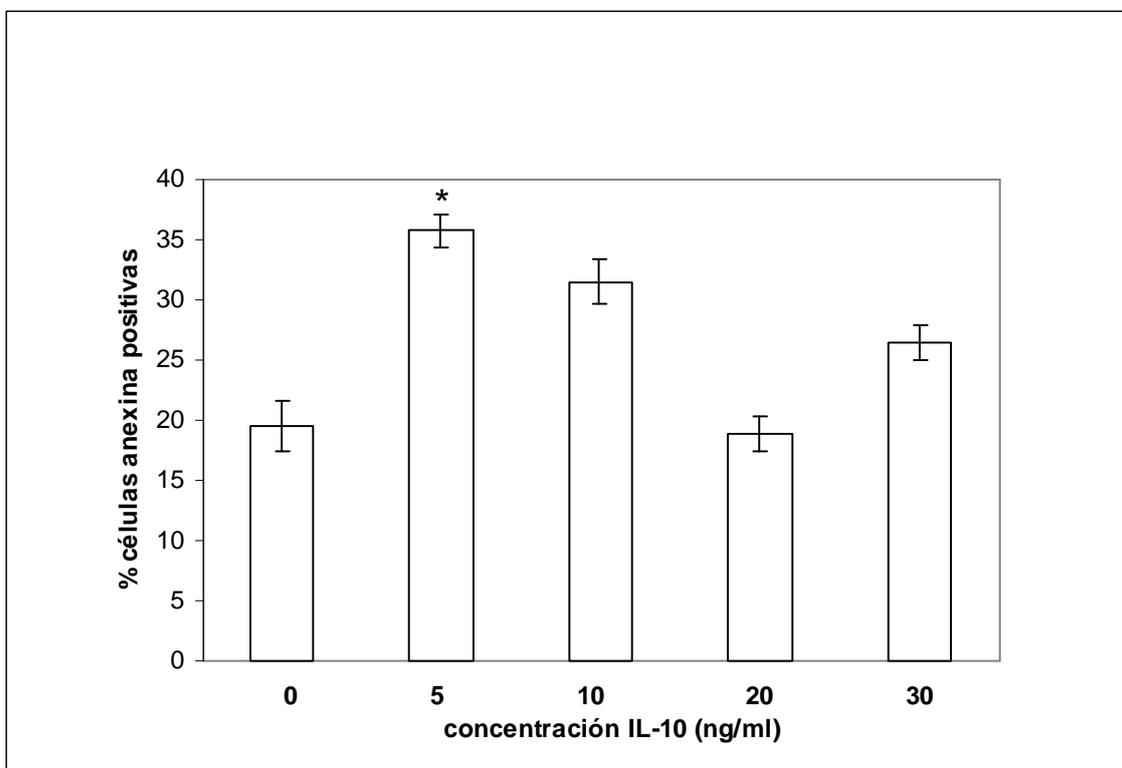


Figura 5. Curva dosis-respuesta de hepatocitos expuestos a IL-10 y TNF- α . Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF- α (30 ng/ml)/sulfasalazina por 12 h y pretratados con IL-10 a diferentes concentraciones (0-30 ng/ml) durante 6 h. La unión a anexina-V se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

Apoptosis temprana y tardía

De acuerdo a los resultados mostrados anteriormente, los hepatocitos se trataron con IL-10 durante 6 h a una concentración de 5 ng/ml previo a la exposición con TNF- α y sulfasalazina.

El tratamiento con TNF- α e inhibidor aumentó significativamente la apoptosis temprana en un 20% respecto al control, así mismo se observó diferencia significativa en los hepatocitos pretratados con IL-10 respecto al control (35%). El pretratamiento con IL-10 aumento significativamente la apoptosis respecto al grupo tratado con TNF- α /sulfasalazina (15%) (Fig. 6).

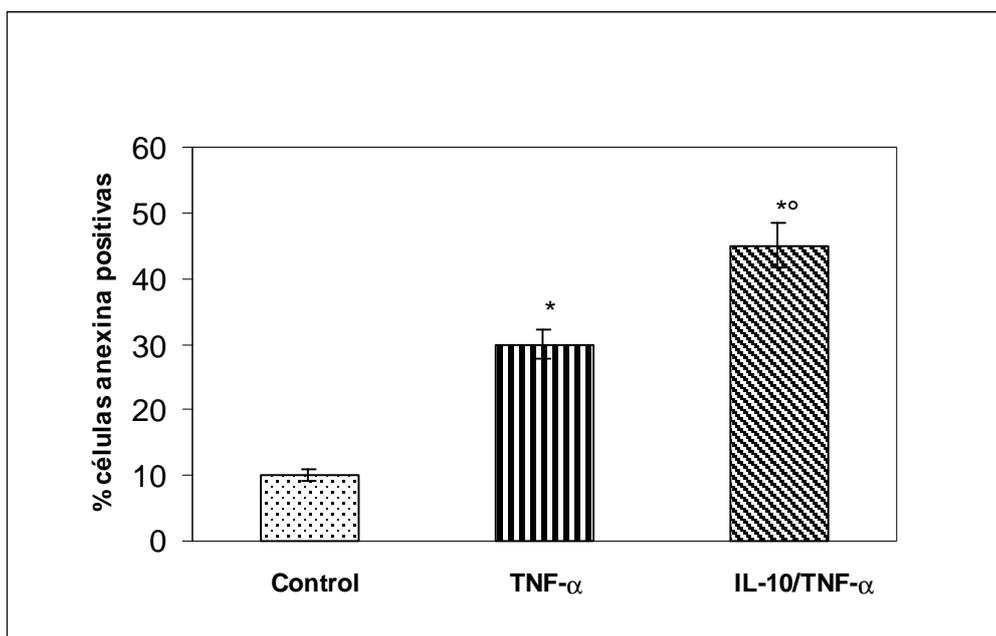


Figura 6. Apoptosis temprana de hepatocitos tratados con IL-10 y TNF- α . Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF- α (30 ng/ml)/sulfasalazina por 12 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ml) por 6 h. La unión a anexina-V se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$). ° Significativamente diferente a las células tratadas con TNF- α /inhibidor ($p < 0.05$).

En cuanto a la apoptosis tardía, la exposición a TNF- α e inhibidor provocó un aumento significativo de 22% respecto al control, así mismo se observó diferencia significativa en los hepatocitos pretratados con IL-10 respecto al control (18%), pero no se observó diferencia entre el grupo con TNF- α y el pretratado con IL-10 (Fig. 7).

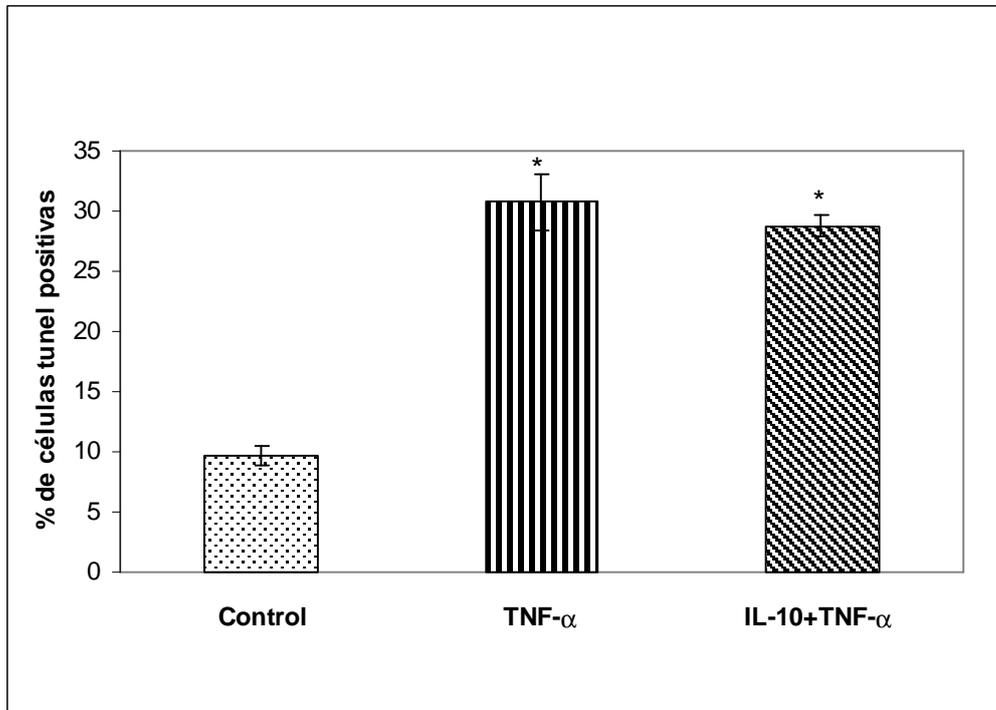


Figura 7. Apoptosis tardía de hepatocitos tratados con IL-10 y TNF- α . Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF- α (30 ng/ml)/sulfasalazina por 12 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ml) por 6 h. El marcaje con TUNEL se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

Caspasa-3 activa

Al obtenerse un aumento en la apoptosis temprana causado por la IL-10, se prosiguió con la determinación del efecto de la interleucina en la caspasa-3 activa, realizándose una curva de tiempo con TNF- α (30 ng/ml)/sulfasalazina y pretratamiento de IL-10, 5 ng/ml durante 6 h. Se observó un aumento máximo de la caspasa-3 activa en los hepatocitos pretratados con IL-10 a 3 h del tratamiento con TNF- α (Fig. 8). Por lo tanto, se realizaron más series de experimentos en ese tiempo con las concentraciones antes mencionadas. Los resultados mostraron un aumento significativo de la caspasa-3 activa respecto al control pero no respecto al pretratamiento con IL-10 (Fig. 9).

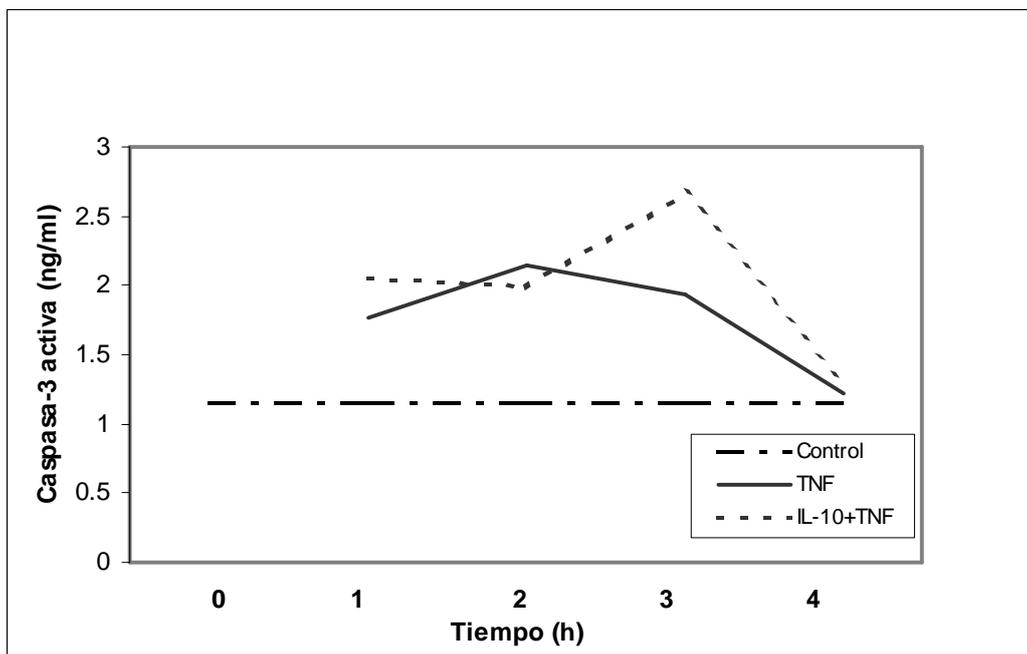


Figura 8. Curva de tiempo para determinar caspasa-3 activa en hepatocitos tratados con IL-10 y TNF- α . Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF- α (30 ng/ml)/sulfasalazina por diferentes intervalos de tiempo y pretratados con IL-10 (5 ng/ml) por 6 h. La cuantificación de caspasa-3 activa se realizó como se describe en Material y Métodos, n=2.

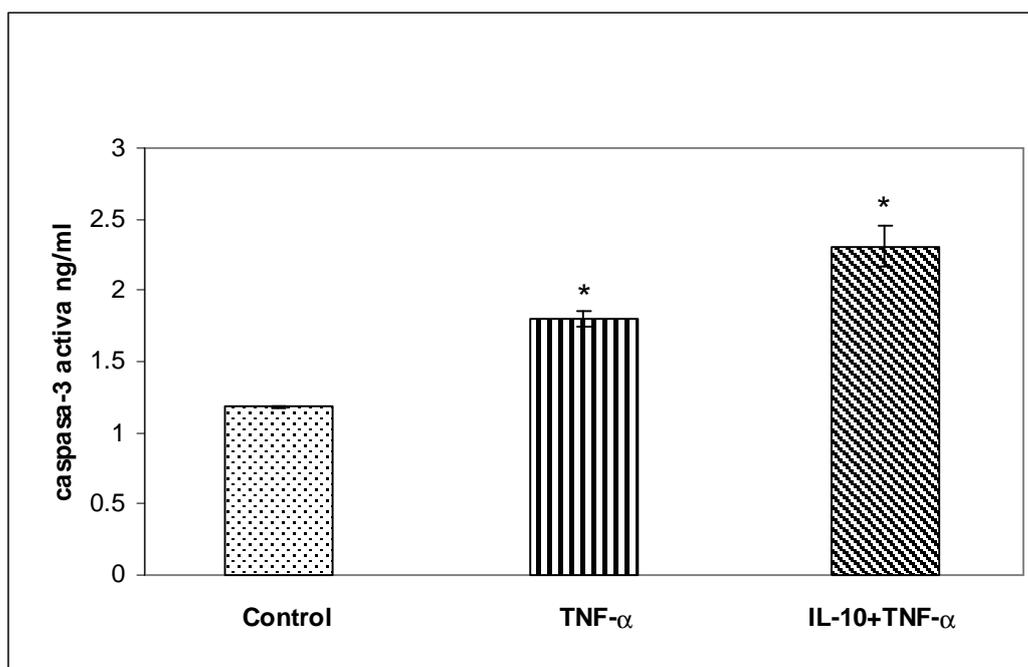


Figura 9. Caspasa-3 activa de hepatocitos tratados con IL-10 y TNF- α . Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF- α (30 ng/ml)/sulfasalazina por 3 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ml) por 6 h. La cuantificación de caspasa-3 activa se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

Disrupción de potencial de membrana mitocondrial

Debido a que no se encontró efecto de la IL-10 en la caspasa-3 activa en la apoptosis inducida por TNF- α , se evaluó la disrupción del potencial de membrana mitocondrial. El TNF- α /sulfasalazina provocó un aumento del 30% de células con disrupción en la membrana, sin embargo el pretratamiento con IL-10 no indujo ningún cambio (Fig 10).

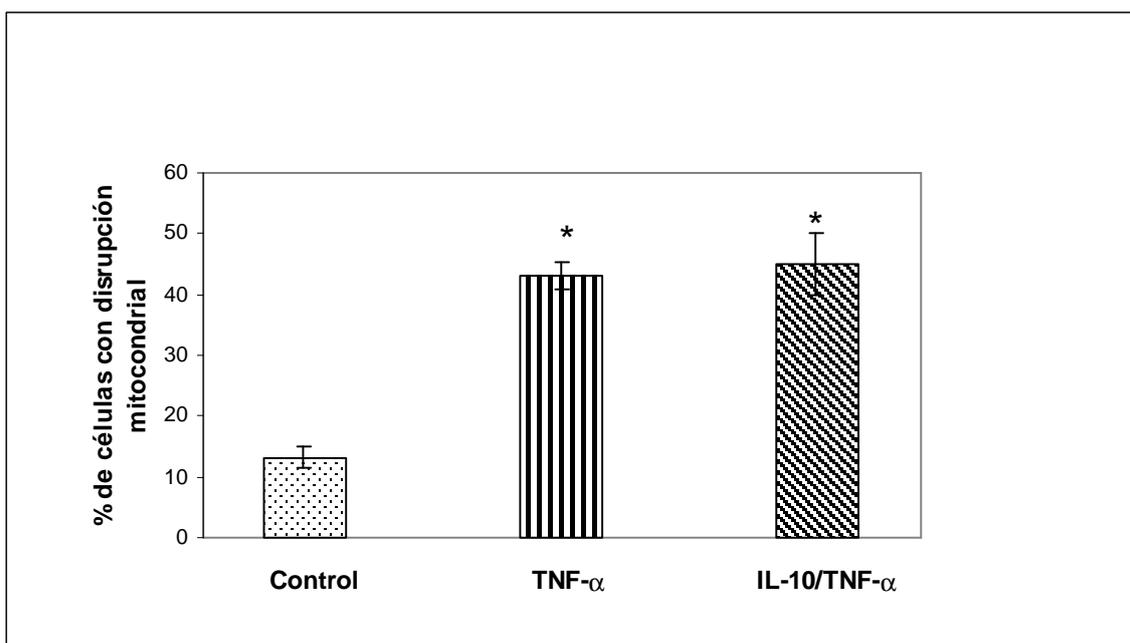


Figura 10. Disrupción de potencial de membrana mitocondrial de hepatocitos expuestos a IL-10 y TNF- α . Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF- α (30 ng/ml)/sulfasalazina por 2 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ml) por 6 h. La disrupción de potencial de membrana se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

Expresión de bax

Se determinó la expresión del gen pro-apoptótico bax mediante RT-PCR al exponer a los hepatocitos a TNF- α con sulfasalazina y pretratamiento con IL-10 y los respectivos controles. En todas las condiciones se observó expresión del gen, sin embargo no se observó diferencia significativa respecto al control (Fig. 11).

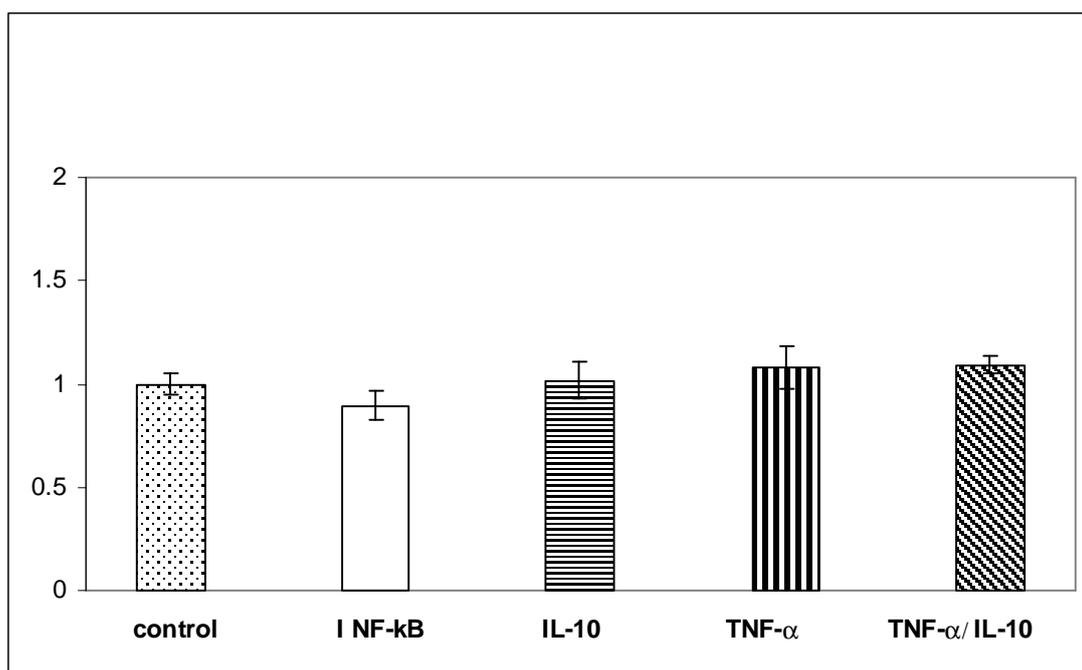


Figura 11. Expresión de bax en hepatocitos expuestos a IL-10 y TNF- α . Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF- α (30 ng/ml)/sulfasalazina por 1 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ml) por 6 h. El RT-PCR se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

6.3 EFECTO DE LA IL-10 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR ETANOL

Apoptosis temprana y tardía

El tratamiento con etanol aumentó significativamente la apoptosis temprana en un 21.5% respecto al control, así mismo se observó diferencia significativa en los hepatocitos pretratados con IL-10 respecto al control (28%). El pretratamiento con IL-10 aumento significativamente la apoptosis respecto al grupo tratado con etanol (Fig. 12).

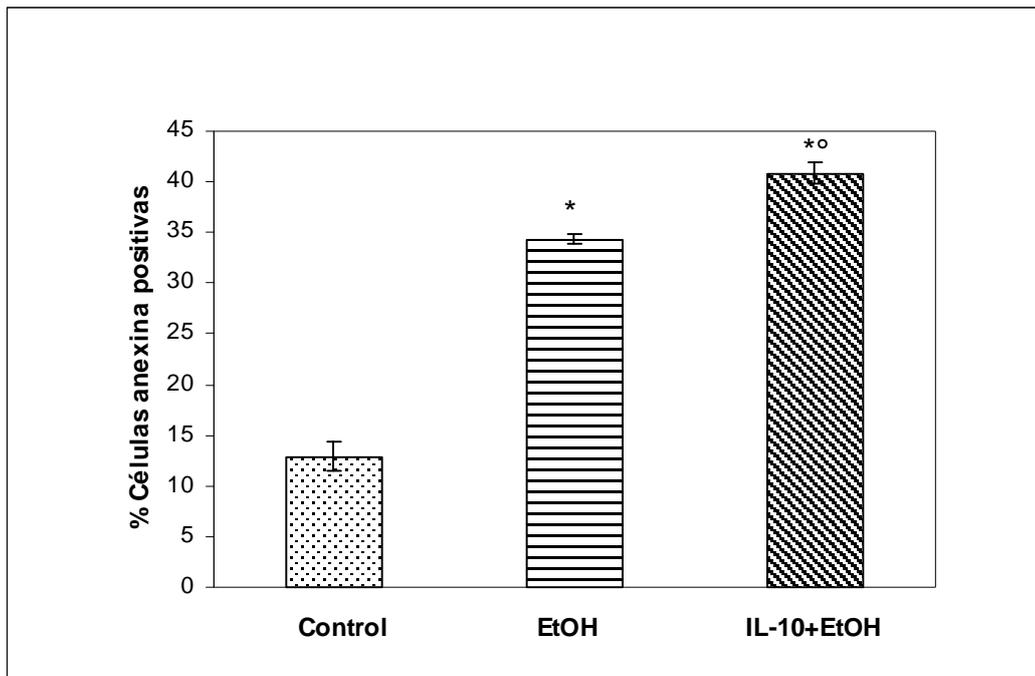


Figura 12. Apoptosis temprana de hepatocitos expuestos a IL-10 y EtOH. Hepatocitos de rata fueron tratados con EtOH 50 mM durante 12 h y pretratados con IL-10 (10 ng/ml) por 6 h. La unión a anexina-V se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

° Significativamente diferente a las células tratadas con EtOH ($p < 0.05$).

El tratamiento con etanol aumentó significativamente la apoptosis tardía en un 22% respecto al control, así mismo se observó diferencia significativa en los hepatocitos pretratados con IL-10 respecto al control (26%). El pretratamiento con IL-10 aumento significativamente la apoptosis respecto al grupo tratado con etanol (Fig. 13).

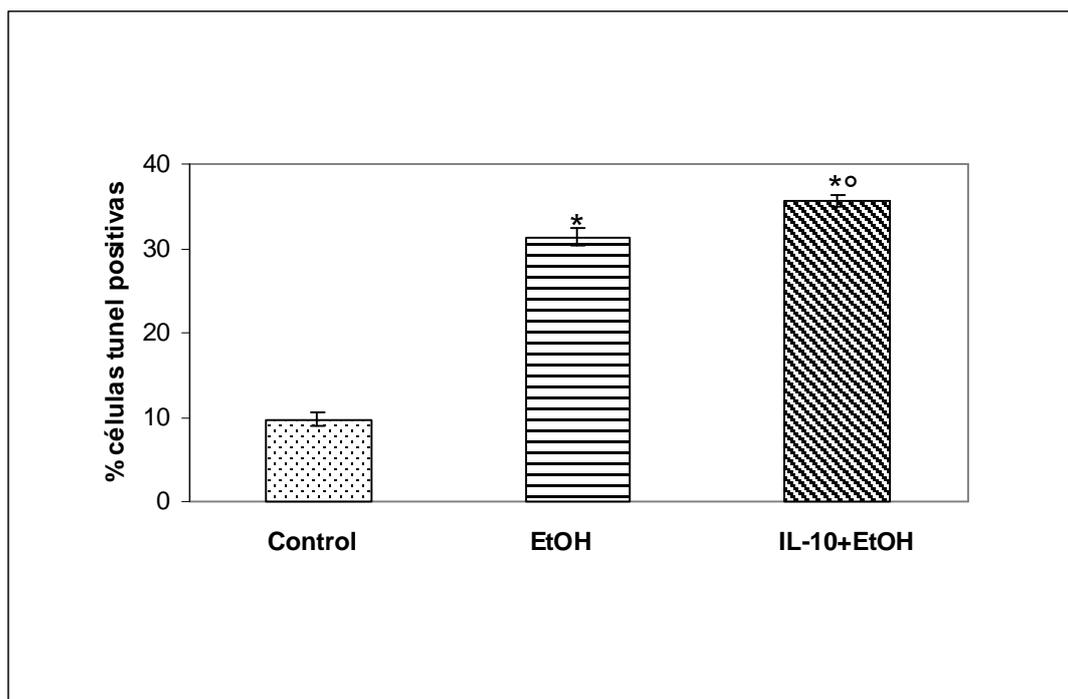


Figura 13. Apoptosis tardía de hepatocitos expuestos a IL-10 y EtOH. Hepatocitos de rata fueron tratados con EtOH 50 mM durante 12 h y pretratados con IL-10 (10 ng/ml) por 6 h. El marcaje con Tunel se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

° Significativamente diferente a las células tratadas con EtOH ($p < 0.05$).

Caspasa-3 activa

Al obtenerse un aumento en la apoptosis temprana y tardía inducida por etanol debido a la IL-10, se prosiguió con la determinación del efecto de la interleucina en la caspasa-3 activa, realizándose una curva de tiempo con etanol 50 mM y pretratamiento de IL-10, 5 ng/ml durante 6 h (Fig 14).

Se observó el mayor aumento de la caspasa-3 activa en los hepatocitos pretratados con IL-10 a 2 h del tratamiento con etanol. Por lo tanto, se realizaron más series de experimentos en ese tiempo con las concentraciones antes mencionadas. Se obtuvo un aumento significativo de la caspasa-3 activa respecto al control pero no respecto al pretratamiento con IL-10 (Fig 15).

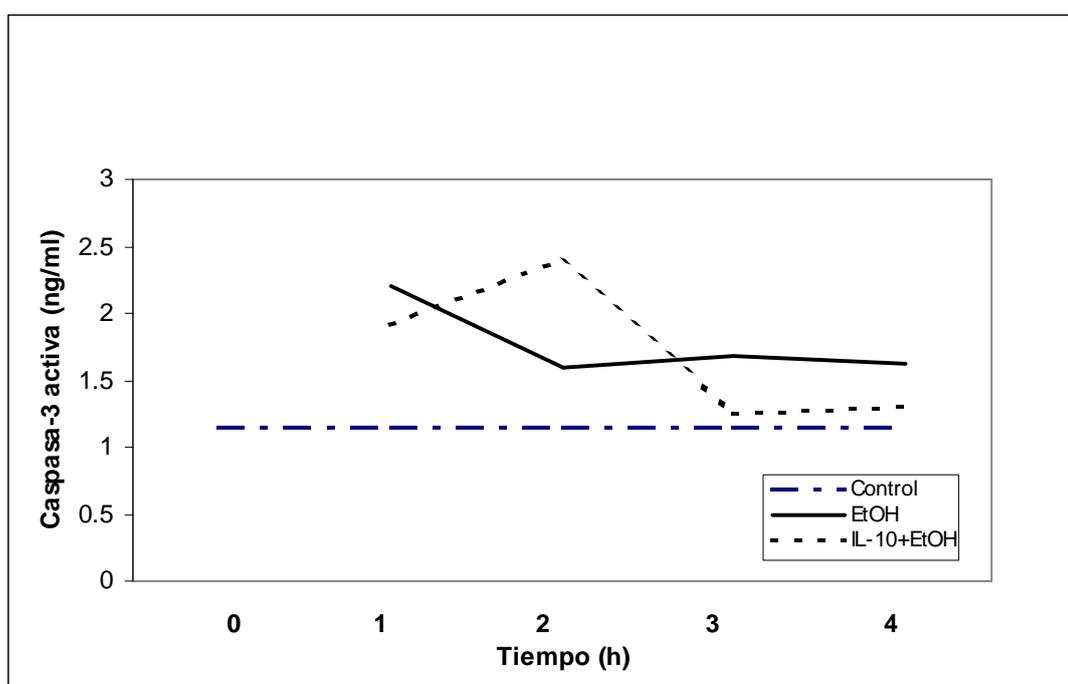


Figura 14. Curva de tiempo para determinar caspasa-3 activa en hepatocitos tratados con IL-10 y Etanol (EtOH). Hepatocitos de rata fueron tratados con EtOH 50 mM por diferentes intervalos de tiempo y pretratados con IL-10 (5 ng/ ml) por 6 h. La cuantificación de caspasa-3 activa se realizó como se describe en Material y Métodos, n=2.

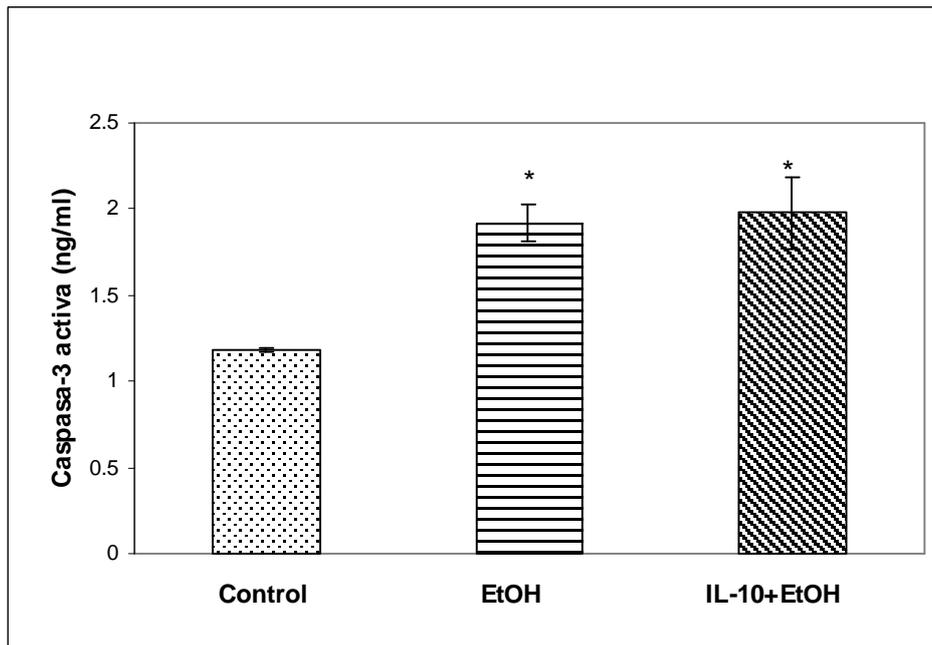


Figura 15. Caspasa-3 activa de hepatocitos tratados con IL-10 y EtOH. Hepatocitos de rata fueron tratados con EtOH 50 mM por 2 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ ml) por 6 h. La cuantificación de caspasa-3 activa se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

Disrupción de potencial de membrana mitocondrial

Debido a que no se encontró efecto de la IL-10 en la caspasa-3 activa en la apoptosis inducida por etanol, se midió la disrupción del potencial de membrana mitocondrial. El etanol provocó un aumento del 23% de células con disrupción en la membrana, sin embargo el pretratamiento con IL-10 no indujo ningún cambio (Fig. 16).

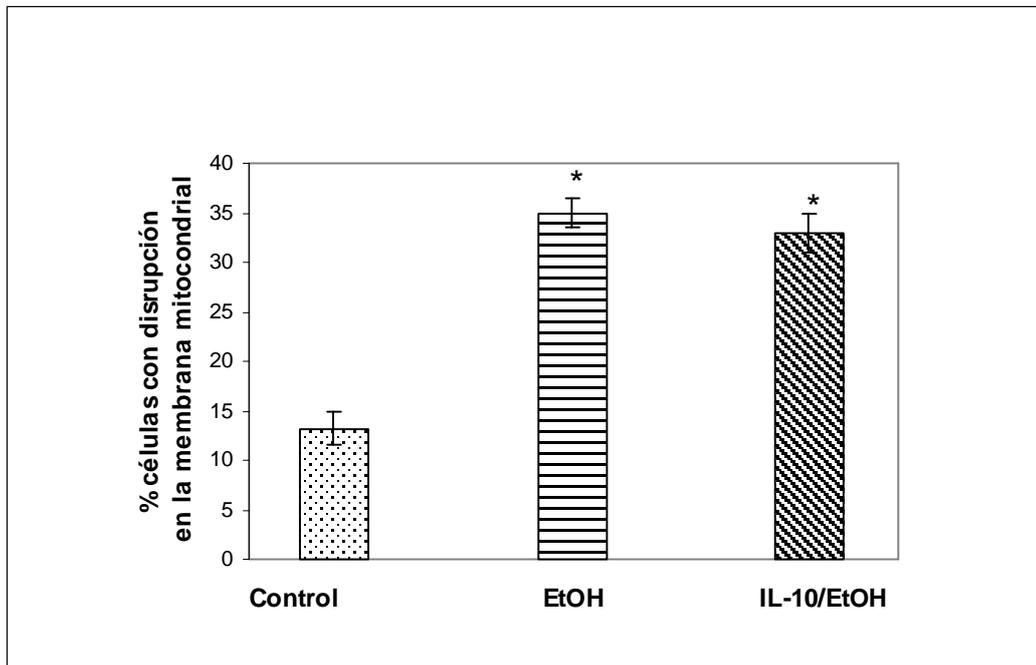


Figura 16. Disrupción del potencial de membrana mitocondrial de hepatocitos expuestos a IL-10 y EtOH. Hepatocitos de rata fueron tratados con EtOH 50 mM por 2 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ml) por 6 h. La disrupción del potencial de membrana se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

Expresión de bax

Se determinó la expresión del gen pro-apoptótico bax mediante RT-PCR al exponer a los hepatocitos a etanol y pretratamiento con IL-10. Se observó la expresión del gen, sin embargo, no se observó diferencia significativa respecto al control (Fig. 17).

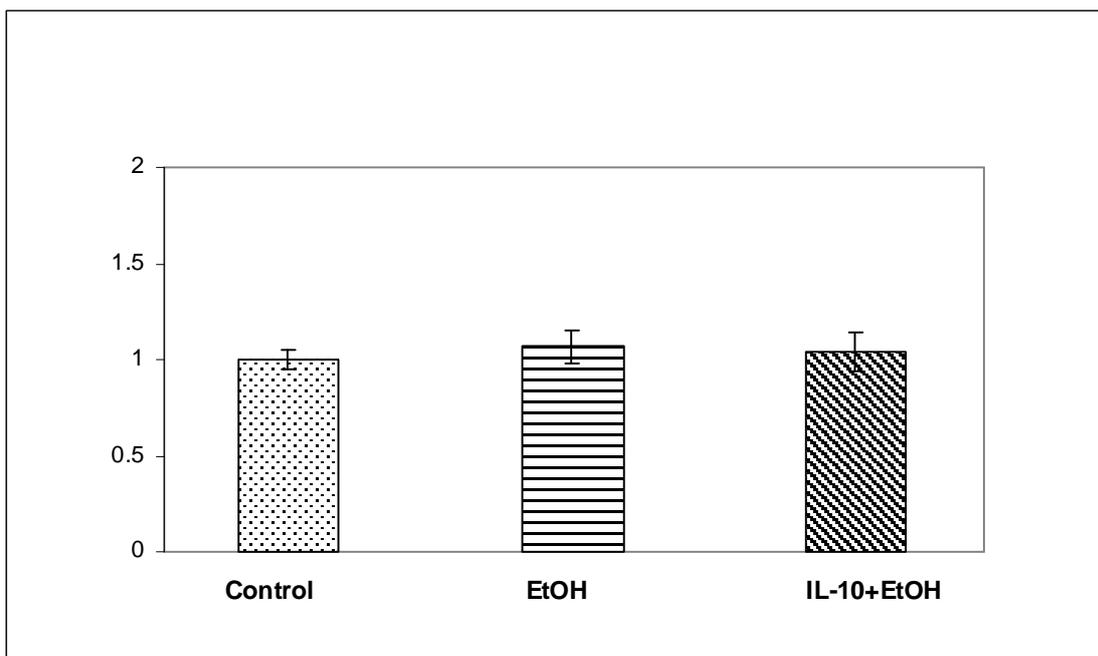


Figura 17. Expresión de bax en hepatocitos expuestos a IL-10 y EtOH. Hepatocitos de rata fueron tratados con EtOH 50 mM por 1 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ ml) por 6 h. El RT-PCR se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

6.4 EFECTO DE LA IL-10 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DISMINUCIÓN DE GLUTATIÓN CAUSADA POR BSO y ETANOL

Apoptosis temprana y tardía

El tratamiento BSO/EtOH aumentó significativamente la apoptosis temprana en un 15% respecto al control, así mismo se observó un aumento del 26% en los hepatocitos pretratados con IL-10 respecto al control (Fig. 18).

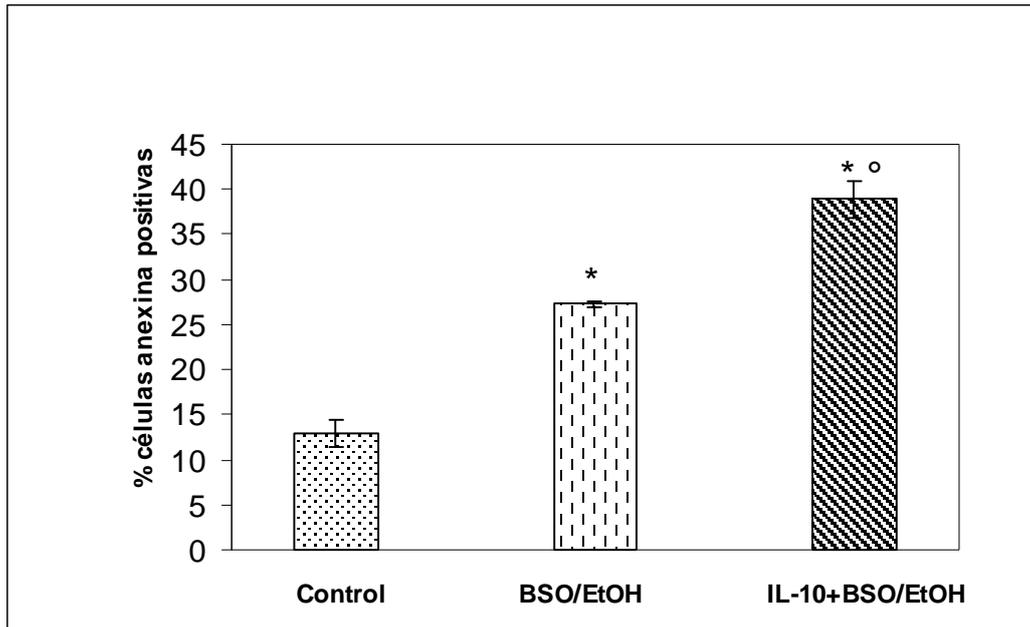


Figura 18. Efecto de la IL-10 y del EtOH con disminución de glutatión citosólico en la apoptosis temprana de hepatocitos. Hepatocitos de rata fueron pretratados con BSO 2 mM y posteriormente expuestos a EtOH 50 mM. Para evaluar el efecto de la IL-10 (10 ng/ml), las células fueron pretratadas por 6 h antes de la exposición. La unión a anexina-V se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$). ° Significativamente diferente a las células tratadas con BSO/ EtOH ($p < 0.05$).

El tratamiento BSO/EtOH aumentó significativamente la apoptosis tardía en un 26% respecto al control, así mismo se observó un aumento del 36% en los hepatocitos pretratados con IL-10 respecto al control (Fig. 19).

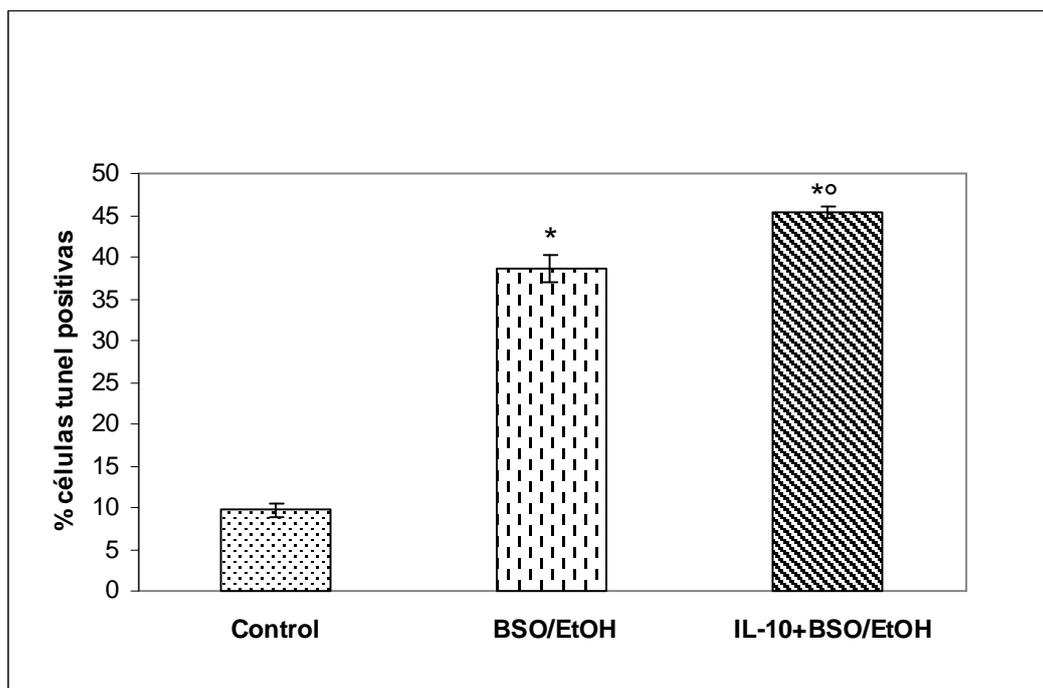


Figura 19. Efecto de la IL-10 y del EtOH con disminución de glutatión citosólico en la apoptosis tardía de hepatocitos. Hepatocitos de rata fueron pretratados con BSO 2 mM y posteriormente expuestos a EtOH 50 mM. Para evaluar el efecto de la IL-10 (10 ng/ml), las células fueron pretratadas por 6 h antes de la exposición. El marcaje con TUNEL se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$). ° Significativamente diferente a las células tratadas con BSO/ EtOH ($p < 0.05$).

Caspasa-3 activa

Al obtenerse un aumento en la apoptosis temprana y tardía inducida por BSO/EtOH debido a la IL-10, se prosigió con la determinación del efecto de la interleucina en la caspasa-3 activa, realizándose una curva de tiempo con BSO 2 mM 6 h + etanol 50 mM y pretratamiento de IL-10, 5 ng/ml durante 6 h (Fig. 20).

Se observó aumento de la caspasa-3 activa en los hepatocitos pretratados con IL-10 a 2 h del tratamiento con BSO/etanol. Por lo tanto, se realizaron más series de experimentos en ese tiempo con las concentraciones antes mencionadas.

Se obtuvo un aumento significativo de la caspasa-3 activa con el pretratamiento de IL-10 respecto al control pero no respecto a la exposición BSO/EtOH (Fig. 21).

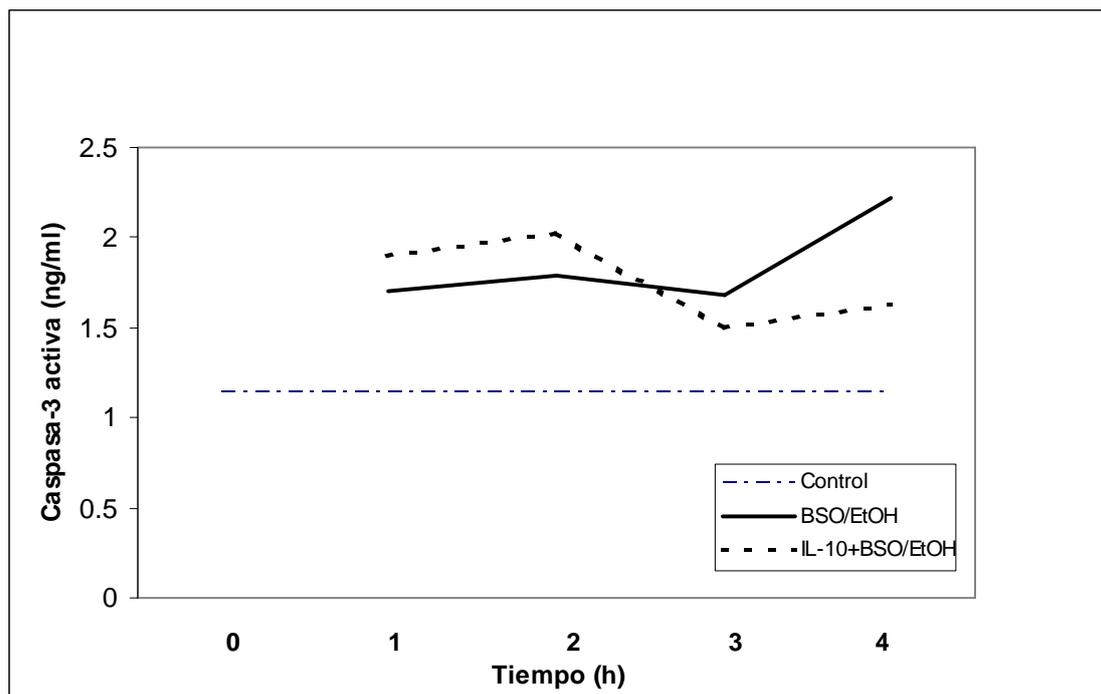


Figura 20. Curva de tiempo para determinar caspasa-3 activa en hepatocitos tratados con IL-10 y BSO/ EtOH. Hepatocitos de rata fueron tratados con BSO 2 mM y EtOH 50 mM por diferentes intervalos de tiempo y pretratados con IL-10 (5 ng/ ml) por 6 h. La cuantificación de caspasa-3 activa se realizó como se describe en Material y Métodos, n=2.

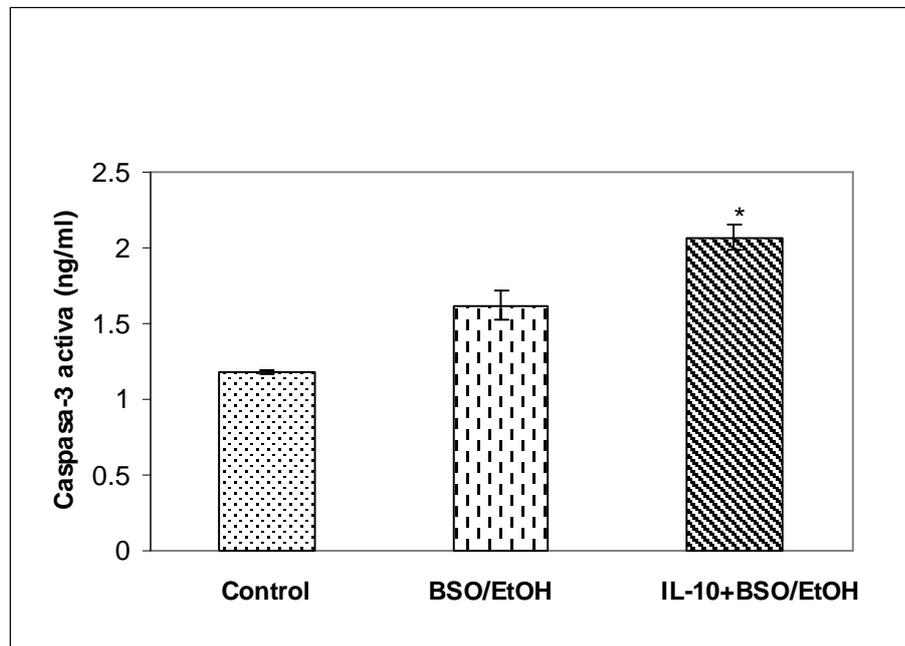


Figura 21. Caspasa-3 activa de hepatocitos tratados con IL-10 y BSO/EtOH. Hepatocitos de rata fueron tratados con BSO 2 mM y EtOH 50 mM por 2 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ ml) por 6 h. La cuantificación de caspasa-3 activa se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

Disrupción de potencial de membrana mitocondrial

Debido a que no se encontró efecto de la IL-10 en la caspasa-3 activa en la apoptosis inducida por BSO/EtOH, se determinó la disrupción del potencial de membrana mitocondrial. El BSO/etanol provocó un aumento del 13% de células con disrupción en la membrana, sin embargo el pretratamiento con IL-10 no indujo ningún cambio comparado con BSO/EtOH (Fig. 22).

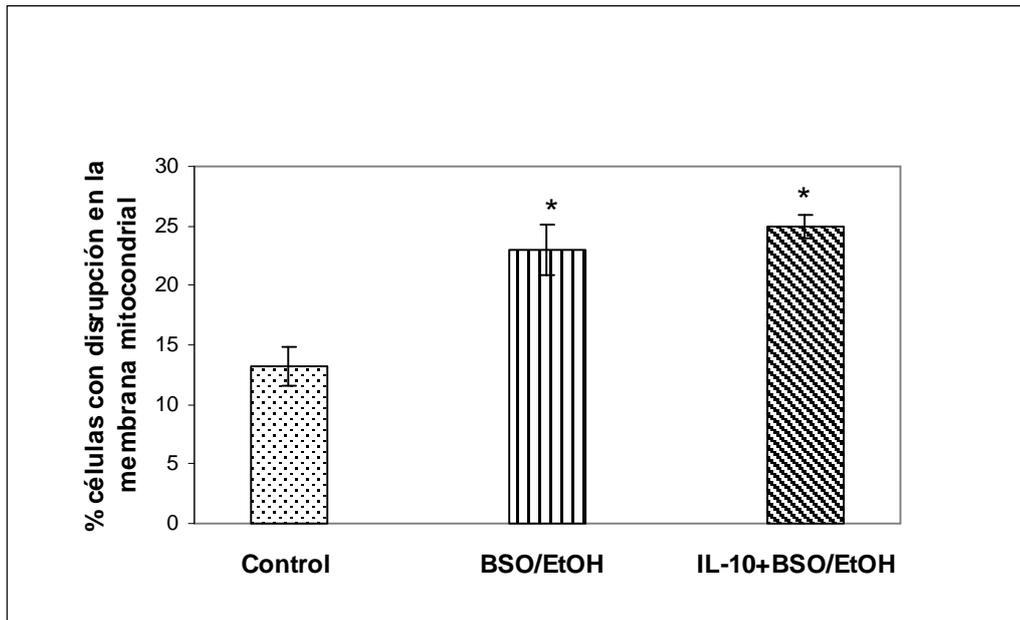


Figura 22. Disrupción de potencial de membrana mitocondrial de hepatocitos expuestos a IL-10 y BSO/EtOH. Hepatocitos de rata fueron tratados con BSO 2 mM y EtOH 50 mM por 2 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ ml) por 6 h. La disrupción de potencial de membrana se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

Expresión de bax

Se determinó la expresión del gen pro-apoptótico bax mediante RT-PCR al exponer a los hepatocitos a BSO/etanol y pretratamiento con IL-10. Se observó expresión del gen, sin embargo no se observó diferencia significativa respecto al control (Fig. 23).

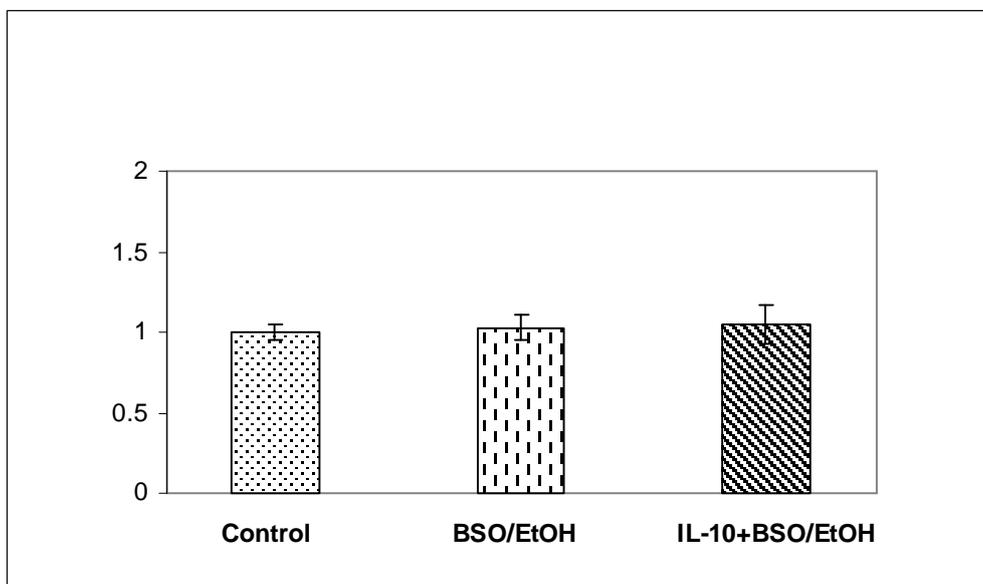


Figura 23. Expresión de bax en hepatocitos expuestos a IL-10 y BSO/ EtOH. Hepatocitos de rata fueron tratados con BSO 2 mM y EtOH 50 mM por 1 h y pretratados con IL-10 (5 ng/ ml) por 6 h. El RT-PCR se realizó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado

6. 5 EXPRESIÓN DE Bcl-2

También se realizó RT-PCR para determinar la expresión del gen anti-apoptótico bcl-2 con los diferentes inductores de apoptosis (TNF- α , EtOH y BSO/EtOH). Se observaron bandas muy tenues a partir de las 3 h de tratamiento, que no fueron cuantificables. Sin embargo, la IL-10 no tuvo efecto en esta expresión.

6.6 ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR- κ B

EMSA

Debido a que el aumento en la apoptosis observado con el pretratamiento de la IL-10 con los diferentes inductores no se pudo explicar con los resultados obtenidos de la caspasa-3 activa, la disrupción del potencial de membrana mitocondrial y la expresión de los genes bax y bcl-2, se realizó un ensayo de electromovilidad para evaluar la activación del NF- κ B. Los hepatocitos de rata fueron expuestos a IL-10 (10 ng/ml) a diferentes intervalos de tiempo desde 1 hasta 4 h. Se observó que la IL-10 previno la activación del NF- κ B (Fig 24 a).

Western Blot

Para confirmar este hallazgo, se examinaron los niveles de I κ B en extractos celulares de hepatocitos mediante Western Blot. Los hepatocitos fueron incubados con IL-10 (10 ng/ml) durante 30, 60, 120, 180 y 240 min. Se prepararon extractos celulares para análisis de los niveles de I κ B- α por western blot. La IL-10 no provocó la degradación de I κ B, confirmando que el NF- κ B no se activó (Fig 24b).

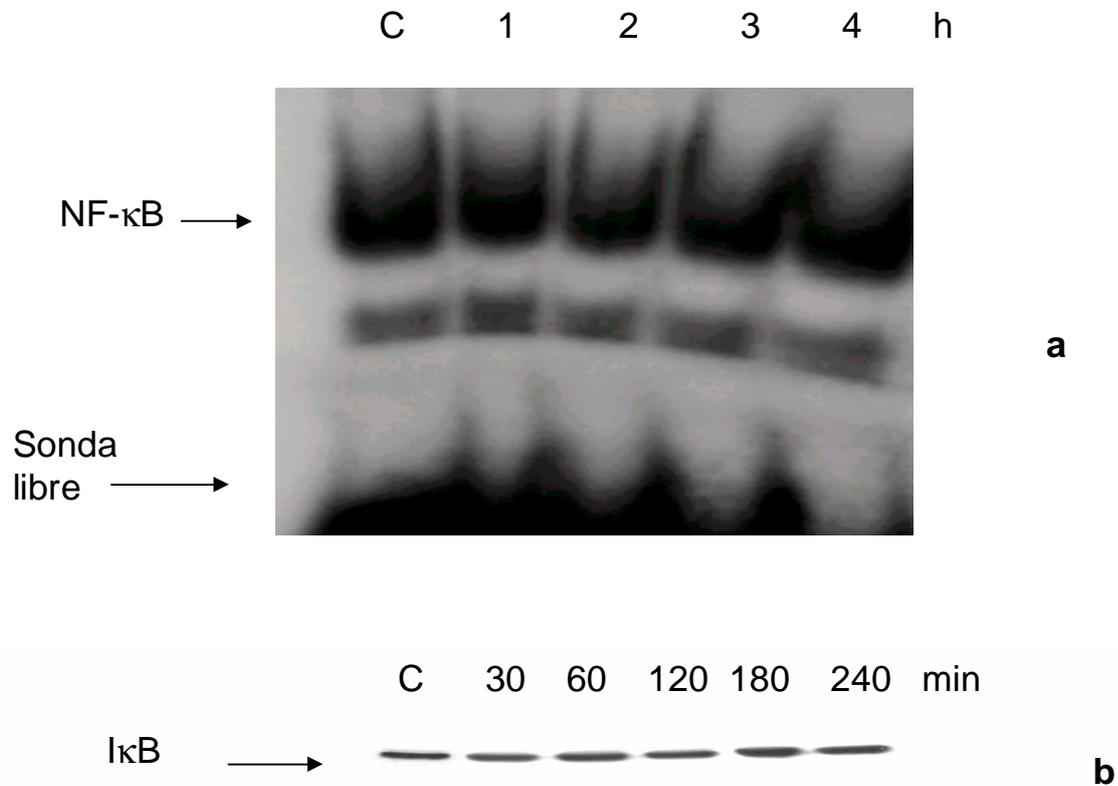


Figura 24. Activación de NF- κ B y curva de tiempo de I κ B- α en hepatocitos de rata tratados con IL-10. Hepatocitos de rata fueron incubados con IL-10 (10ng/ml) durante 1, 2, 3 y 4 h. Los extractos nucleares de hepatocitos de rata se prepararon y analizaron por EMSA. La imagen es representativa de tres experimentos independientes realizados por triplicado (a). Hepatocitos de rata fueron incubados con IL-10 (10 ng/ml) durante 30, 60, 120, 180 y 240 min. Se prepararon extractos celulares para análisis de los niveles de I κ B- α por western blot. La imagen es representativa de tres experimentos independientes realizados por triplicado (b).

Inhibición de la activación de NF-κB

Para confirmar que la inhibición de la activación del NF-κB produce apoptosis en hepatocitos, las células fueron tratadas con TNF-α (30 ng/ml) por 12 h y pretratados con sulfasalazina 0.05mM por 1 h, un inhibidor del NF-κB. Cuando los hepatocitos fueron expuestos solamente al TNF-α no hubo apoptosis. Por el contrario, la apoptosis aumentó un 23% con sulfasalazina y TNF-α (Fig 25).

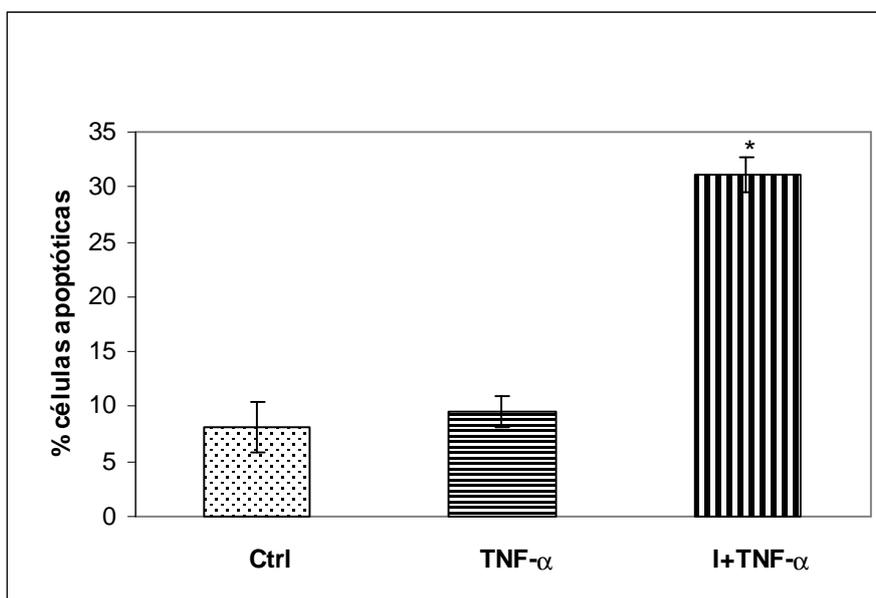


Figura 25. Apoptosis de hepatocitos expuestos a TNF-α. Hepatocitos de rata fueron tratados con TNF-α (30 ng/ml) por 12 h. Para evaluar el efecto del inhibidor de NF-κB, los hepatocitos fueron pretratados con sulfasalazina 0.5 mM por 1 h. La apoptosis se determinó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media ± E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control (p<0.05).

6.7 EFECTO DE LA IL-10 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR CICLOHEXIMIDA/ TNF- α EN CÉLULAS HepG2.

Se evaluó el efecto de la IL-10 en la apoptosis de células de hepatoblastoma humano HepG2, debido a que estudios previos de Quiroz y col., 2005 mostraron que la IL-10 activa al NF-kB en estas células. El tratamiento con etanol no indujo apoptosis en células HepG2 (datos no mostrados). Como previamente se ha reportado, cuando las células HepG2 fueron tratadas con cicloheximida (40 μ M) y TNF α (30 ng/ml) por 12 h, se observó un 38% de células apoptóticas. El pretratamiento con IL-10, abatió la apoptosis inducida por cicloheximida/TNF α (Fig 26). Cuando las células fueron tratadas solamente con TNF- α o IL-10 no se indujo apoptosis (datos no mostrados).

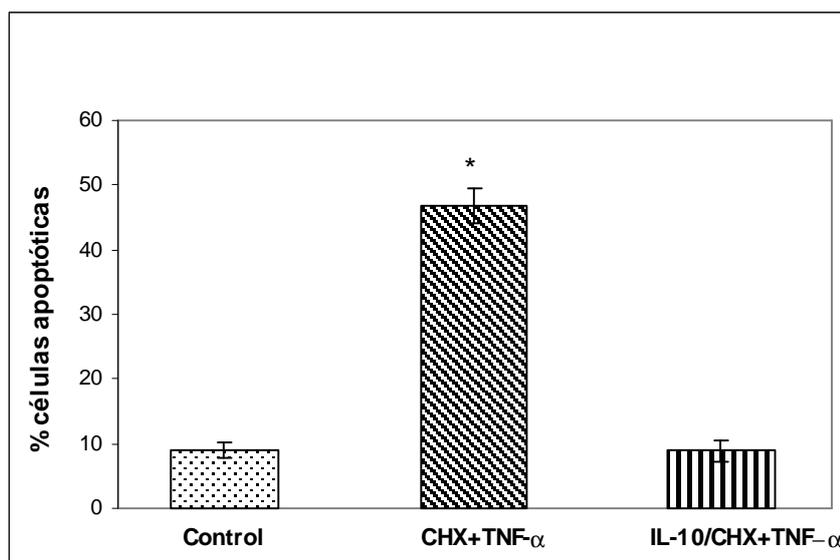


Figura 26. Apoptosis de células HepG2 expuestas a Cicloheximida (CHX) y TNF- α y pretratadas con IL-10. Las células se trataron durante 1 h con CHX 40 μ M y luego fueron expuestas a TNF- α (30 ng/ml) por 12 h. Para evaluar el efecto de la IL-10 (10 ng/ml), las células fueron pretratadas durante 6 h antes de la exposición. La apoptosis se determinó como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la media \pm E.S. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. *Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

Los mecanismos involucrados en la progresión del daño hepático y la fibrosis son complejos y muchos no han sido comprendidos en su totalidad. La apoptosis parece jugar un papel crítico en el desarrollo de estos procesos, por lo que su modulación terapéutica podría representar un gran potencial para alterar el curso de las enfermedades hepáticas.

El presente estudio muestra que la IL-10, citocina anti-inflamatoria relacionada con los procesos fibrogénicos hepáticos, tiene un efecto en la apoptosis de hepatocitos, el cual no está vinculado con la disrupción del potencial de membrana mitocondrial, con la activación de caspasa-3 o con la expresión de ciertos genes involucrados en los procesos de muerte celular. El efecto producido por la interleucina se debe a su capacidad para activar al NF- κ B, factor encargado de la transcripción de genes de supervivencia celular, y no a que intervenga en eventos de la cascada de señalización apoptótica

Para inducir apoptosis en los hepatocitos se crearon condiciones *in vitro* semejantes a las presentes en el daño hepático crónico como son la inflamación y el estrés oxidativo.

Los resultados muestran que el TNF- α por sí sólo no induce apoptosis en los hepatocitos aislados de rata, por lo tanto se utilizó pretratamiento con sulfasalazina, inhibidor del NF- κ B, y TNF- α para inducir apoptosis. La señalización por TNF- α es compleja y usualmente no induce apoptosis a menos de que las señales de supervivencia del NF- κ B se encuentren desacopladas. Se ha reportado que la inhibición del NF- κ B sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por TNF- α (Hatano y Bremmer, 2001). La señalización intracelular mediada por receptores TNF-R1 incluye señales tanto apoptóticas como de supervivencia. El acoplamiento del TNF-R1 con TNF- α permite que la proteína adaptadora TRADD se una al dominio de muerte del receptor. TRADD recluta varias moléculas de señalización hacia el receptor activado provocando apoptosis de manera similar a la activada por Fas. Por otra parte, la asociación de moléculas como RIP y TRAF-2 al receptor activan una proteína cinasa inductora de NF- κ B permitiendo que el NF- κ B se transloque al núcleo e inicie la transcripción de genes, la mayoría involucrados en vías de supervivencia (Wajant y Scheurich, 2001).

El etanol induce apoptosis en los hepatocitos de rata como se observa en los resultados. Estudios realizados por Higuchi y col. (2001) muestran que la intoxicación aguda con etanol, a una concentración similar a la utilizada en estos experimentos, provoca apoptosis de hepatocitos de rata en cultivo primario *in vitro*, debido a estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno pueden causar disfunción mitocondrial, provocando la liberación de factores pro-apoptóticos tales como el citocromo C (Higuchi y col, 2001). La señalización mediada por receptores de muerte también ha sido asociada con la apoptosis inducida por alcohol, especialmente por Fas y TNF- α (Feldstein y col, 2003) . El receptor Fas se encuentra altamente expresado en hepatocitos de pacientes con hepatitis alcohólica comparada con controles. Más aún, niveles de Fas soluble y FasL se encuentran aumentados en pacientes con hepatitis severa alcohólica (Yoon y Gores, 2002).

El TNF- α es un factor que se considera altamente involucrado en la hepatitis alcohólica. Los niveles séricos de esta citocina/ligando de muerte se encuentran incrementados en pacientes con esta enfermedad y se correlacionan con la mortalidad (Natori y col, 2001). La administración crónica de alcohol incrementa los receptores a TNF- α 1 en hepatocitos. La regulación positiva del sistema TNF- α durante la exposición a alcohol vuelve a los hepatocitos muy susceptibles a la apoptosis, lo que sugiere un papel muy importante de esta citocina en la fisiopatología de la enfermedad hepática alcohólica (Rust y Gores, 2000). Se ha reportado que el alcohol puede sensibilizar a los hepatocitos a la apoptosis inducida por TNF- α mediante la disminución de glutatión mitocondrial o alterando el estado redox de la célula (Miñana y col, 2002). Por estas razones se indujo apoptosis en los hepatocitos aislados de rata con etanol y posteriormente exposición a TNF- α esperando que la apoptosis aumentara, sin embargo, no se encontró diferencia significativa respecto al grupo tratado sólo con etanol. El que la apoptosis no se incrementara puede deberse a la diferencia en el modelo experimental utilizado. Miñana y col. (2002), utilizaron hepatocitos de ratas alimentadas por varias semanas con alcohol, y posteriormente, volvieron a exponerlas al tóxico. Del mismo modo, utilizaron células HepG2 con sobreexpresión

del CYP2E1, las cuales metabolizan el alcohol de forma distinta a los hepatocitos en cultivo primario.

Se ha reportado que el GSH participa de manera importante en la protección contra el estrés oxidativo producido por el CYP2E1 en hepatocitos y que la mitocondria pudiera ser el “blanco” de las especies reactivas de oxígeno derivadas de este citocromo (Wu y Cederbaum, 2001). Así mismo, la toxicidad del alcohol se incrementa cuando los niveles de GSH disminuyen por tratamiento con BSO, efecto que se previene con antioxidantes (Fernández-Checa y col, 1991). La remoción del GSH de las células que expresan el CYP2E1 resulta en activación de la caspasa 3 y apoptosis así como necrosis. Los resultados del presente estudio muestran que el BSO provocó un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas, que puede explicarse por la disminución del glutatión citosólico, reportado en condiciones similares a la de estos experimentos. La apoptosis se incrementó todavía más con la posterior exposición a etanol, ya que como ha sido reportado, este último genera estrés oxidativo en las células, el cual es difícil de combatir debido a la disminución en el sistema antioxidante de la célula.

Los resultados muestran que la IL-10 promueve la apoptosis temprana y tardía, inducida por TNF- α y sulfasalazina, EtOH y BSO/EtOH en hepatocitos de rata. Sin embargo, en las curvas de dosis y tiempo de exposición se observa que el efecto de esta citocina depende tanto de su concentración como del tiempo de exposición. Se ha demostrado que la IL-10 actúa de forma pleiotrópica dependiendo del tipo celular. La IL-10 induce apoptosis en mastocitos derivados de médula ósea, observándose disminución en la expresión de *bcl-X_L* y *bcl-2*. (Yeatman y col., 2000). Estudios realizados por Schmidt y col. (2000), muestran que la IL-10 induce apoptosis en monocitos de sangre periférica de forma dosis-tiempo dependiente, observándose una regulación positiva de CD95. Anticuerpos anti- ligando CD95 inhiben la apoptosis inducida por esta citocina. Por otra parte, la IL-10 protege directamente a células progenitoras mieloides de la apoptosis. Esta actividad se inhibe significativamente con anticuerpos contra el receptor para IL-10 (Zhou y col., 2001).

Los tres inductores de apoptosis utilizados en el presente estudio (TNF- α , etanol y BSO) aumentaron significativamente la caspasa-3 activa y la disrupción de membrana mitocondrial, eventos clave en la cascada apoptótica. Sin embargo, la IL-10 no modificó estos valores, y dado que se conoce que el NF- κ B está involucrado con la expresión de genes de supervivencia, se realizaron experimentos para evaluar el efecto de la IL-10 en la activación del factor nuclear. El NF- κ B es un factor de transcripción que puede ser activado por gran variedad de citocinas y agentes mitógenos, y es un regulador clave involucrado en la respuesta inflamatoria ante una infección (Roman y col, 1999). Se ha postulado que la activación del NF- κ B forma parte de una respuesta ante el estrés ya que es activado por varios estímulos incluyendo factores de crecimiento, citocinas, luz UV, agentes farmacológicos y otros agresores. En su forma inactiva, el NF- κ B se encuentra secuestrado en el citoplasma, unido a miembros de la familia de proteínas inhibidoras I κ B. La variedad de estímulos que activan al NF- κ B provocan la fosforilación de I κ B, la cual es seguida por su ubiquitinación y degradación subsecuente (Roman y col, 2000; Manna y Aggarwal, 1998).

En el presente trabajo, se demostró que la IL-10, citocina anti-inflamatoria, previene la activación del NF- κ B en hepatocitos de rata. Estudios previos de nuestro grupo (Gómez y col., 2005) mostraron que esta citocina activa al factor en células HepG2. Por lo tanto, la IL-10 ejerce un efecto diferencial en la activación del factor dependiendo del tipo celular.

Del mismo modo, la IL-10 podría ejercer un efecto diferente en hepatocitos en regeneración, análogo al de las células de hepatoma donde protegería de la apoptosis, mientras que en hepatocitos maduros con algún daño, por ejemplo el inducido por alcohol, podría promover la muerte celular.

De acuerdo a los resultados obtenidos podría postularse que el efecto de la IL-10 en la apoptosis involucra la activación del NF- κ B. Se ha establecido que la activación del NF- κ B es esencial para proteger a los hepatocitos de la apoptosis. El uso de ratones “knockout” para una de las cinco subunidades del NF- κ B, RelA, ha mostrado que los animales mueren a los 15 o 16 días de desarrollo

embriológico debido a apoptosis hepática masiva (Doi y col, 1999). Más aún, la inhibición farmacológica de la activación del NF- κ B también resulta en la inducción de muerte celular (Hatano y Bremmer, 2001). Además, se ha descrito que la IL-4 protege de la apoptosis mediante la cooperación de la familia de factores de transcripción NF- κ B (Zamorano y col, 2001).

Para confirmar que la inhibición de la activación del NF- κ B en hepatocitos de rata induce apoptosis en células expuestas a TNF- α , las células fueron pretratadas con sulfasalazina (conocido inhbidor del NF- κ B), observándose un incremento en la apoptosis, reafirmando el papel de este factor nuclear en la sobrevivida celular.

El efecto de la IL-10 en la apoptosis de hepatocitos de rata observado en este estudio puede ser de particular interés debido a la posible relación directa que ha surgido recientemente entre fibrosis y apoptosis (Canbay col, 2004). Se ha propuesto que al contrario de la apoptosis fisiológica, la apoptosis patológica resultante de la inflamación y fibrosis, puede retroalimentar el proceso dañino. Se ha propuesto que la eliminación de los restos apoptóticos mediante fagocitosis puede estimular directamente la fibrogénesis (Fadok y col, 1998; Canbay y col, 2003).

Las células estelares hepáticas (CEH) cuentan con la maquinaria necesaria para fagocitar cuerpos apoptóticos. El englobamiento de cuerpos apoptóticos por las CEH estimula la expresión de TGF- β e induce la producción de colágena I, mayor consittuyente de las lesiones cirróticas (Lauber y col, 2003). El englobamiento de los cuerpos apoptóticos de hepatocitos por CEH y células de Kupffer aumenta la expresión de genes pro-fibrogénicos y ligandos de muerte. La activación persistente de estas células promueve la apoptosis de hepatocitos, culminando en inflamación hepática y activación sostenida de las CEH (Canbay y col, 2004).

Se ha descrito que las células de hepatoma humano son muy resistentes a la apoptosis, especialmente a la inducida por Fas (Ogawa y col, 2003). Los niveles de Fas expuestos en la superficie celular son relativamente bajos en hepatomas (Yano y col, 1996) y los tejidos de hepatocarcinoma muestran significativamente menos caspasa-3 que el tejido no canceroso adyacente (Sun y col, 2000). En nuestros experimentos, fue necesario pretratar a las células HepG2 con

cicloheximida, inhibidor de síntesis de proteínas, previo a la exposición con TNF- α para poder inducir apoptosis. Para comprobar la veracidad de nuestras observaciones y basados en el hecho de que las células HepG2 mantienen varias funciones hepáticas, pero no expresan cantidades significativas de citocromo P450 (mediante el cual el etanol genera estrés oxidativo provocando apoptosis) (Wu y Cederbaum, 2001), las células HepG2 fueron expuestas a etanol sin encontrarse indicios de apoptosis.

A diferencia de los hepatocitos de rata, el pretratamiento con IL-10 abatió la apoptosis inducida por cicloheximida y TNF- α , corroborando la naturaleza pleiotrópica de la citocina.

La IL-10 ha sido utilizada como terapia antifibrótica en pacientes con daño hepático crónico. Sin embargo, debido a su naturaleza pleiotrópica y a los resultados del presente estudio, su uso debe ser cauteloso, ya que la citocina podría aumentar el daño promoviendo la proliferación de células cancerosas al inhibir su apoptosis o incrementar la fibrosis del hígado al promover la apoptosis de hepatocitos.

8. CONCLUSIONES

El presente estudio muestra el papel pleiotrópico de la IL-10, en la apoptosis de hepatocitos. El efecto observado se relaciona con la activación del NF- κ B, factor de transcripción encargado de la expresión de genes de supervivencia y al parecer, la IL-10 no interviene en eventos clave en la cascada apoptótica, como son la activación de caspasa-3, la disrupción del potencial de membrana mitocondrial o la activación de ciertos genes pro y anti-apoptóticos.

El tipo celular es muy importante al tratar de caracterizar los efectos de las citocinas, ya que en hepatocitos de rata en cultivo primario, la IL-10 tiene un efecto pro-apoptótico, mientras que en células de hepatoblastoma humano el efecto es contrario.

Este trabajo contribuye con nuevos conocimientos acerca del mecanismo mediante el cual, la IL-10 afecta de manera diferencial la apoptosis de células cancerosas respecto a hepatocitos sanos a través de la activación del NF- κ B.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, B. Apoptosis and Nuclear Factor-kB: a tale of association and dissociation. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1033-1039.
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S y Martinou J. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 2000; 345: 271-278.
- Armeanu S, Pathil A, Venturelli S y Mascagni P. Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. *J Hepatol* 2005; 42:210-217.
- Bai J y Cederbaum A. Overexpression of catalase in the mitochondrial or cytosolic compartment increases sensitivity of HepG2 cells to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000. 275(25):19241-9.
- Bailey S y Cunningham C. Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1998; 28:1318-1326.
- Bailey S y Cunningham C. Effect of dietary fat on chronic ethanol-induced oxidative stress in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23:1210-1218.
- Bailey S, Pietsch E y Cunningham C. Ethanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complexes I and III. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:891-900.
- Bailey S, Pietsch E, Cunningham y Young T. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:726-733.
- Bantel H, Luger A y Poremba C. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001; 34:758-767.
- Barnes, P.J., y Karin, M. Nuclear Factor-kB, a pivotal factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336:1066-1071.
- Berlerr B y Stadtman E. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272:20313-20316.

- Cahill A, Cunningham C, Adachi M, Ishii H, y Bailey S. Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26:907-915.
- Canbay A, Friedman S, Gores G. Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004; 39:273-278.
- Canbay A, Taimr P, Torik N, Higuchi H, Friedman S, Gores G. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003; 83:655-663.
- Casey, C., Nanji, A., Cederbaum, A., Adachi, M. y Takahashi, T. Alcoholic liver disease and apoptosis. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 49S-53S.
- Chen, Q. y Cederbaum, A. Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P4502E1 in HepG2 Cells. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 638-648.
- Colle A, García-Ruiz C, Miranda M y Mari M. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to TNF. *Gastroenterology* 1998; 115:1541-1551.
- Chomczynski, PA. Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissues samples. *Biotechniques* 1993; 15 536-53717.
- Doi T, Marino M, Takahashi T, Obata Y. Absence of tumor necrosis factor rescues rel A deficient mice from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2994-2999.
- Fadok V, Bratton D, Konowal A y Freed P. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta *J Clin Invest* 1998; 101:890-898.
- Feldstein A, Canbay A, Angulo P, Tanai M, Gores G. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125:437-443.
- Fernández-Checa J, García-Ruiz C, Ookhtens M, Kaplowitz N. Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol fed rats. *J Clin Invest* 1991; 87:397.

- French, S. Mechanisms of alcoholic liver injury. *Can J Gastroenterol* 2000; 14:327-332.
- Galle, P. Apoptosis in liver disease. *J Hepatol* 1997; 27:405-412.
- Gómez L, París R, Lluís J, Bubio L, Souza, Hernández E, Santiago M, Fernández-Checa J, Kershenovich D, y Gutiérrez MC. Differential modulation of Interleukin 4 and Interleukin 10 in HepG2 cells treated with acetaldehyde. *Liver Inter* 2005; 25:122-130.
- Gores G y Yoon J. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol* 2002, 37: 400-410.
- Grunfeld, C., Soued, M., Adi., S., Moser, A.H., Fiers, W., Dinarello, C.A. and Feigold, K.R. Interleukin 4 inhibits stimulation of hepatic lipogenesis by TNF, IL-1 and IL-6 but not by INF alpha. *Cancer Res* 1991; 51 2803-2807.
- Haddad J, Fahlman C. Redox and oxidant-mediated regulation of IL-10 an anti-inflammatory cytokine? *Biochem Bio Res Comm* 2002; 297:163-176.
- Haddad J, Saade N, Safieh-B. Interleukin-10 and the regulation of mitogen activated protein kinases: are these signaling modulate targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cell Signall* 2003; 15:255-267.
- Hatano E, Bremmer D. Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alfa and fas-mediated apoptosis through NF-kB activation. *AJP Gastroint Liver Physiol* 2001; 281:G1357.
- Henson PM, Bratton D, Fadak V. The phosphatidylserine receptor a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:627-633.
- Higuchi H, Adachi M, Miura S, Gores G. The mitochondrial permeability transition contributes to acute ethanol induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 34:320-328.
- Jurgensmeier J, Xie Z, Bredesen D y Reed J. Bax directly induces realese of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:4997-5002.

- Koteish A, Yang S, Huang X y Diehl A. Chronic ethanol exposure potentiates lipopolysaccharide liver injury despite inhibiting jun N-terminal kinase and caspase 3 activation. *J Biol Chem* 2002; 277:13037-13044.
- Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H e Ishii H. Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 1997; 25:368-378.
- Lauber K, Bohn E, Krober S, y Xia A. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3 mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 2003; 113: 1188-1198.
- Lefkowitz, J. Pathology of the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17:197-204.
- Lieber, C. Alcohol and the liver. *Mount Sinai J Med* 2000; 67:84-94.
- Liedtke, C., Plumpe, J., Bradham, C., Brenner, D., y col. Jun Kinase modulates tumor necrosis factor dependent apoptosis in liver cells. *Hepatology* 2002; 36:315-325.
- Louis, H., Van Laethem, J., Wu, W., Quertinmont, E., Degraef, Ch., Van der Berg, K., Demols, A., Goldmna, M., Le Moine, O., Geerts, A. and Devierre, J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28:1607-1615
- Lowry, H.O., Rosebrough, J.N., Farr, L.A., y Randall J.R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Lumeng, L. y Crabb, D. Alcoholic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17:211-220.
- Magnani, M., Crinelli, R., Bianchi, M. Y Antonelli A. The ubiquitin dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of NF- κ B. *Curr Drug Targets*; 2000, 14:387-399.
- Makarov, S. NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol Med Today* 2000; 6:441-448.
- Manna SK, Aggarwal BB. Interleukin-4 down-regulates both forms of tumor necrosis factor receptor and receptor-mediated apoptosis, NF- κ B, AP-1 and c-jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1998; 273:33333-33341.

- Miñana J, Gomez L, Lloret A, Pallardo F, Escudero A. Sastre J. Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology* 2002; 35:1205-1214.
- Miyoshi H, Rust C, Roberts P y Gores G. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* 1999; 117:669-677.
- Mocellin S, Panelli MC, Wang E. The dual role of IL-10. *Trends Immunol* 2003; 24:36-43.
- Nanji, A.A., Jokelainen.K, Rahemtulla, A., Miao. L., Fogt. F., Matsumoto, H., Tahan, S.R., y Su, G.L. Activation of Nuclear Factor Kappa B and Cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999; 30: 934-943.
- Napoli, J., Bishop, G.A., McGuinness P.H., Painter, D.M., McCaughan, G.W., Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; 24 759-765.
- Natori S, Rust C, Stadheim L, Srinivasan A, Gores G. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *H Hepatol* 2001; 34:248-253.
- Nelson D, Lauwers G, Lau J y Davis G. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000, 118 (4):655-660.
- Ogawa K, Yasumura S y Atarashi Y. Sodium butyrate enhances Fas-mediated apoptosis of human hepatoma cells. *J Hepatol* 2003; 32: 1178-1185.
- Parola, M y Robino, G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35:297-306.
- Reitamo S, Remitz A, Tamai K y Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblast. *J Clin Invest* 1994; 94:2489-2492.
- Relic B, Guicheux J, Mezin F y Lubberts E. IL-4 and IL-13, but not IL-10 protect human synoviocytes from apoptosis. *J Immunol* 2001; 166:2775-2782.

- Roman J, Colell A, Blasco C. Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HepG2 cells: Effect on transcription factors AP-1 and NF-kB. *Hepatology* 1999; 30: 1473-1480.
- Roman J, Gimenez A Lluís JM. Enhanced DNA binding and activation of transcription factor NF-kB and AP-1 by acetaldehyde in HepG2 cells. *J Biol Chem* 2000. 275:14684-14690.
- Rust, C. y Gores, G. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000; 108:567-574.
- Sastre J, Miñana J, Alguacil P, Molet G, Gomez-Cambroner L, Viña J. Chronic ethanol feeding causes oxidative stress in rat liver mitochondria. *Free Radic Res* 1999; 30:325-327.
- Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney Blood Press Res* 2000; 23:173-174.
- Scaffidi C, Fulda S y Srinivasa A. Two CD95 signalling pathways. *EMBO J* 1998; 17:1675-1687.
- Schmidt M, Luger N, Pavels H. IL-10 induces apoptosis in human monocytes involving the CD95 receptor ligand pathway. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1769-77.
- Schuchmann, M. y Galle, R. Apoptosis in liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13(7):785-790.
- Schuster N, Dunker N y Kriegelstein K. TGF beta induced cell death in the developing chick retina is mediated via activation of c-Jun N terminal kinase and downregulation of Bcl-XL. *Neurosci Lett* 2002; 27:239-242.
- Shreiber M y Hayward A. Neoantial injection of CD3 antibody into obese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. *J Immunol* 1987; 143:1555-9.
- Simon N, Jolliet P, Morin C, Zini P y col. Glucocorticoids decrease cytochrome C oxidase activity of isolated rat kidney mitochondria. *FEBS Lett* 1998; 435:25-28.
- Stewart S, Jones D. y Day C. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. *TRENDS Mol Med* 2001; 7(9):408-413.
- Strand S, Hofmann W y Gambihler A. Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilsons disease involve CD95 mediated apoptosis. *Nat Med* 1998; 4:588-593.

- Sun BH, Zhang J y Wang BJ. Analysis of in vitro patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocarcinoma and its relationship to p21 and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000; 6:356-360.
- Taieb J, Mathurin P y Poynard T. Raised plasma soluble Fas and Fas-ligand in alcoholic liver disease, *Lancet* 1998; 351:1930-1931.
- Thompson K, Maltby J, Millward H y Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation fibrosis. *Hepatology* 1998, 28:1597-606.
- Tsukamoto H. Is interleukin 10 antifibrogenic in chronic liver injury?. *Hepatology*, 2000; 28(6):1997-1998.
- Viña J, Hem R, Krebs H. Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes. *Biochem J* 1978; 170:627-630.
- Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33:19-32.
- Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 302-308.
- Wooten M. Function for NF- κ B in neuronal survival regulation by atypical protein kinase C. *T Neuroscience Res*; 1999, 58(5):207-211.
- Wu D y Cederbaum A. Removal of glutathione produces apoptosis and necrosis in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:619-628.
- Yano H, Fukuda K, Haramaki M et al. Expression of Fas and anti-Fas mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cell lines. *J Hepatol* 1996:25 454-464.
- Yeaman F, Jacobs S y Gillespie S. Combines Stimulation with the T helper cell type 2 cytokines IL-4 and IL-10 induces mouse mast cell apoptosis. *J Exp Med* 2000; 193:1103.
- Yumoto E, Higashi T, Nouse K y Tsuji T. Serum gamma-interferon-inducing factor and IL-10 levels in patients with acute hepatitis and fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:285-94.

-Yoon J, Gores G. Death receptor mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol* 2002; 37:400-410.

-Zamorano J, Mora A, Boothby M, Keegan A. NF- κ B activation plays an important role in the IL-4 induced protection from apoptosis. *Int Immunol* 2001; 13:1479-87.

-Zhou J, Broussard S, Strile K, Freun G. IL-10 inhibits apoptosis of promyeloid cells by activating insulin receptor substrate-2 and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 2001; 167:4436-42.

10. ARTÍCULO PUBLICADO



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Life Sciences xx (2005) xxx–xxx

Life Scienceswww.elsevier.com/locate/lifescie

1

Differential effect of interleukin-10 on hepatocyte apoptosis

2

Mariana Santiago-Lomelí^{a,*}, Luis E. Gómez-Quiroz^a, Víctor M. Ortiz-Ortega^b,
David Kershenobich^c, Ma. Concepción Gutiérrez-Ruiz^a

3

4

^aDepartamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F. México

5

^bDepartamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán,
México, D.F. México

6

7

^cDepartamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, México, D.F. México

8

Received 2 September 2004; accepted 23 October 2004

9

10

Abstract

11

Current data suggests that hepatocyte apoptosis is an essential feature contributing to several chronic liver diseases. It has been shown that IL-10 has diverse and potentially pleiotropic actions that suggest that it may have a direct effect on apoptosis. It has been established that NF- κ B activation is essential to protect hepatocytes from apoptosis. The purpose of the present work is to evaluate the effect of the anti-inflammatory cytokine, IL-10 on the activation of NF- κ B in primary cultured rat hepatocytes and hepatoblastoma (HepG2) cell line and explore its consequences on apoptosis.

12

13

14

15

16

17

Apoptosis was induced by TNF- α and cicloheximide in HepG2 hepatoblastoma cells and by ethanol and a glutathione depletor in primary cultured rat hepatocytes. NF- κ B activation was determined by EMSA.

18

19

IL-10 increased ethanol induced apoptosis in primary culture rat hepatocytes (28%). These effects were enhanced when the cells were pre-treated with IL-10 under conditions of oxidative stress (glutathione depletion). The effects of IL-10 on primary cultured hepatocytes were independent of NF- κ B activation. When apoptosis was induced by cicloheximide and TNF- α in hepatoblastoma cells, pretreatment with IL-10 was accompanied by a decrease of 38% in apoptosis. IL-10 did not have any effect on the signaling cascade of apoptosis but caused a significant increase in NF- κ B activation. When NF- κ B activation was inhibited by sulfasalazine the decrease in apoptosis was reversed. The present study demonstrates the importance of differential cell marking when trying to characterize the effects of cytokines in their contribution to liver cell apoptosis. The study

20

21

22

23

24

25

26

27

* Corresponding author.

E-mail addresses: marsantiagolom@yahoo.com.mx (M. Santiago-Lomelí), megr@xanum.uam.mx (M.C. Gutiérrez-Ruiz).

provides insight into the mechanisms by which IL-10 affects apoptosis through a differential effect on NF- κ B activation. 28

© 2005 Published by Elsevier Inc. 29

Keywords: Apoptosis; IL-10; NF- κ B; Rat hepatocytes; HepG2 30

Introduction 32

Current data suggests that hepatocyte apoptosis is an essential feature contributing to several chronic liver diseases (Canbay et al., 2004; Natori et al., 2001; Yoon and Gores, 2002). The mechanisms initiating and perpetuating liver damage are not well understood. Increasing evidence indicates that apoptosis is a prominent feature and may be responsible for the cellular default of hepatocytes and loss of liver function (Feldstein et al., 2003; Henson et al., 2001; Savill, 2000; Cahill et al., 2002). 33

While there are many studies indicating that pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and TGF- β 1 can induce hepatocyte apoptosis, the role of anti-inflammatory cytokines has not been thoroughly examined in this context (Higuchi et al., 2001; Miñana et al., 2002; Fernández-Checa et al., 1991). It may not be the absolute levels of a particular cytokine that is most important, but the ratio of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines that may determine the clinical presentation (Sastre et al., 1999; Wu and Cederbaum, 2001; Wajant and Scheurich, 2001). 34

The anti-inflammatory cytokines are a series of immunoregulatory molecules that control the pro-inflammatory cytokine response. Their physiologic role in inflammation and their pathologic role in systemic inflammatory stage are increasingly recognized. In particular, IL-10 inhibits the synthesis of a number of cytokines such as IFN- γ , IL-2 and TNF- α on Th1 subpopulations of T-cells but not of Th2 cells (Haddad and Fahlman, 2002; Haddad et al., 2003). Previous work of our group has shown that IL-10 activates nuclear factors NF- κ B and AP-1 in HepG2 cells (Gómez et al., 2004). Furthermore, it is known that NF- κ B activation is essential to protect hepatocytes from apoptosis (Doi et al., 1999; Hatano and Bremmer, 2001; Zamorano et al., 2001). 35

The purpose of the present work is to evaluate the effect of the anti-inflammatory cytokine, IL-10 on the activation of NF- κ B in primary cultured rat hepatocytes and hepatoblastoma (HepG2) cell line and explore its consequences on apoptosis. 36

Materials and methods 37

Cell culture 38

The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was obtained from the American Type Culture Collection (Maryland, USA) at passage number 79. All cells used in this work were between passage 90 and 120. HepG2 cells retain many parenchymal cell functions. HepG2 cells were routinely grown in monolayer culture in Williams E medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories Inc., Logan Utah, USA), penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Cells were grown at 37 °C in disposable plastic bottles (Nunc, USA), in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. The medium was replaced twice a week, and cells were trypsinized and re-seeded at a ratio of 1:3 once a week. 39

Hepatocyte isolation 65

Hepatocytes were isolated from male Wistar rats (200–250 g) by collagenase perfusion, as described previously (Viña et al., 1978). Viability was assessed by trypan blue exclusion and 90–95% viability was routinely obtained. Rat hepatocytes were cultured in Dulbecco's medium containing 20 mU/ml insulin, 10% fetal bovine serum, penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 mg/ml). After allowing the hepatocytes during 2 h to attach, cells were washed twice with saline buffer phosphate (PBS) to remove cell debris and dead cells. The cells were allowed to spread out for 12 h. After that, treatments were added as indicated in experimental design.

Experimental design 73

HepG2 cells were seeded at a density of 2.5×10^4 cells/cm². All cells were seeded at the same time. Twenty four hours after seeding the cells, the culture medium was changed for one containing EtOH (50 mM). In other instances, cells were treated with cicloheximide (40 μM) and TNF-α (30 ng/ml). To evaluate the role of IL-10 (10 ng/ml R and D systems, Minneapolis, USA), it was administered 6 h before treatment. At the end of the exposure, cells were washed twice with PBS, and trypsinized for apoptosis determination.

Hepatocytes were seeded at a density of 2.5×10^4 cells/cm². Twelve hours after seeding the cells, the culture medium was changed for one containing 50 mM EtOH (final concentration). The flasks were kept tightly closed and wrapped with parafilm to prevent evaporation of EtOH. At the end of the exposure, cells were washed twice with PBS, and trypsinized for apoptosis, active caspase-3 and mitochondrial membrane disruption determination. In other instances cells were scrapped for isolation of total RNA for bax determination. To evaluate the role of glutathione depletion, buthionine sulfoximine 2 mM (BSO) was added to the medium 6 hrs before EtOH. IL-10 (10 ng/ml, R and D systems, Minneapolis, USA) was administered for 6 hr before EtOH and BSO/OH treatment. In other instances, hepatocytes were only exposed to IL-10 (10 ng/ml). At the end of the exposure they were scrapped for mobility shift assays and IκB-α Western blot analysis.

Hepatocytes were also treated with TNF-α (30 ng/ml) and sulfasalazine (0.5 mM), a NF-κB inhibitor, for apoptosis determination.

Apoptosis determination 92

Apoptosis was determined by flow cytometry using TACS Annexin V-FITC and FlowTACS kits (R and D). Annexin V is an anticoagulant protein that preferentially binds negatively charged phospholipids, exposed on the outer leaflet of the cytoplasmic membrane during apoptosis. FlowTACS kit is based on TUNEL apoptosis detection.

Active caspase-3 determination 97

Active caspase-3 was measured using a quantitative immunoassay kit (R and D). A biotinilated inhibitor is bound to the large subunit of the active caspase-3. The inhibitor does not bind to the inactive caspase-3. The addition of streptoavidine during the ELISA allows the quantification of active caspase-3.

4	<i>M. Santiago-Lomeli et al. / Life Sciences xx (2005) xxx–xxx</i>	
	<i>Mitochondrial membrane disruption</i>	102
	Mitochondrial membrane disruption was determined using a DePsipher assay (R and D), in which a lipophilic cation aggregates through the polarized membrane forming a red fluorescent complex. If the membrane potential is altered, the cation does not enter the transmembranal space and remains in its monomeric green form. Fluorescence is analyzed by flow cytometry.	103 104 105 106
	<i>RNA preparation and PCR amplification</i>	107
	Total cellular RNA was isolated by lysing the cells with trizol as described by Chomczynski (Chomczynski, 1993). RT-PCR of bax was performed using upstream primer 5'-GGATGCGTCCAC-CAAGAAGC-3' and downstream primer 5'-CACCTGGTCTTGGATCCAG-3', the mRNA expression was quantified using a phosphorimager and accompanying ImageQuant software, and was standardized with the $\beta 2$ microglobulin housekeeping gene signal to correct any variability in gel loading.	108 109 110 111 112
	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>	113
	Nuclear extracts of rat hepatocytes were prepared and analyzed by EMSA. Activation of transcription factor NF- κ B was examined using a consensus oligonucleotide of NF κ B (5'-AGTTGAGGG-GACTTCCCAGGC-3') as described by Roman et al. (Roman et al., 2000).	114 115 116
	<i>IκB-α Western blot analysis</i>	117
	I κ B- α Western analysis was performed on the primary cultured hepatocytes, as described in Roman et al. (Roman et al., 2000) at various times after IL-10 addition.	118 119
	<i>Data analysis</i>	120
	Data are reported as mean \pm S.E. for at least three independent experiments carried out in triplicate. The SPSS package version 8 was used for statistical significance. Comparison among groups was done by means of ANOVA. Tukey's method was used for multiple comparisons. A $p < 0.05$ was considered as statistically significant.	121 122 123 124
	Results	125
	<i>IL-10 and apoptosis</i>	126
	<i>IL-10 promotes ethanol induced apoptosis on primary culture rat hepatocytes</i>	127
	Ethanol treatment induced apoptosis in rat hepatocytes as demonstrated by annexin V and tunnel staining. Accordingly, annexin V and tunnel staining increased 21.5% from basal values, which further increased to 28% (annexin) and 26% (tunnel) when hepatocytes were pretreated with IL-10 (Figs. 1 and 2). IL-10 by itself, in the absence of EtOH, did not increase apoptosis (data not shown).	128 129 130 131 132

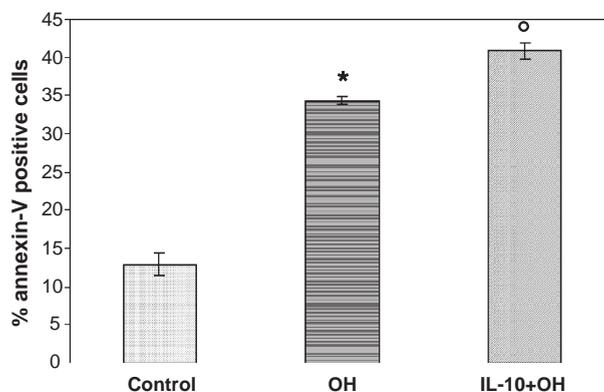


Fig. 1. Annexin-V binding of hepatocytes exposed to Ethanol (EtOH). Rat hepatocytes were treated with EtOH 50 mM for 12 h and pretreated with IL-10 (10 ng/ml) for 6 h. Annexin-V binding was determined as described in Materials and methods. Values represent mean \pm S.E. for three independent experiments carried out in triplicate. * Significantly different from control ($p < 0.05$). ^o Significantly different from OH treated cells ($p < 0.05$).

GSH depletion by BSO enhanced apoptosis 11% from basal levels (Fig. 3). When EtOH was added 133
 apoptosis escalated to 23% (Fig. 3). Based on these findings, we chose BSO/EtOH to induce apoptosis 134
 and evaluate the IL-10 effect. Under such conditions, when hepatocytes were pretreated with IL-10, 135
 apoptosis was enhanced as demonstrated by an increase of 26% in annexin-V binding (Fig. 4) and 35.5% 136
 in tunel staining (Fig. 5). 137

IL-10 abolishes cicloheximide/TNF- α induced apoptosis in HepG2 cells

 138

Ethanol treatment did not induce apoptosis in HepG2 cells (data not shown). As previously 139
 reported, when HepG2 cells were treated with cicloheximide and TNF α for 12 hrs we were able to 140
 detect 38% of apoptotic cells (Fig. 6). Pretreatment with IL-10 abolished the cicloheximide/TNF α 141
 induced apoptosis (Fig. 6). No apoptosis occurred when cells were treated either with TNF- α or IL-10 142
 (data not shown). 143

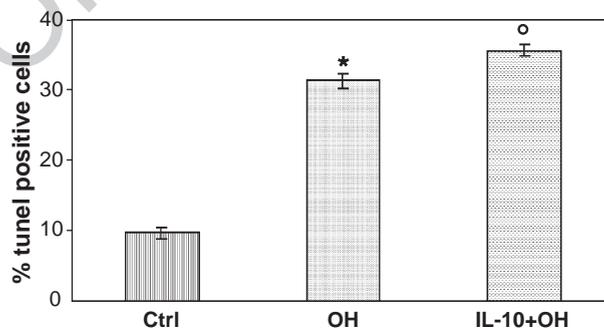


Fig. 2. TUNEL staining of hepatocytes exposed to Ethanol (EtOH). Rat hepatocytes were treated with OH 50 mM for 12 h and pretreated with IL-10 (10 ng/ml) for 6 h. TUNEL staining was determined as described in Materials and methods. Values represent mean \pm S.E. for three independent experiments carried out in triplicate. * Significantly different from control ($p < 0.05$). ^o Significantly different from OH treated cells ($p < 0.05$).

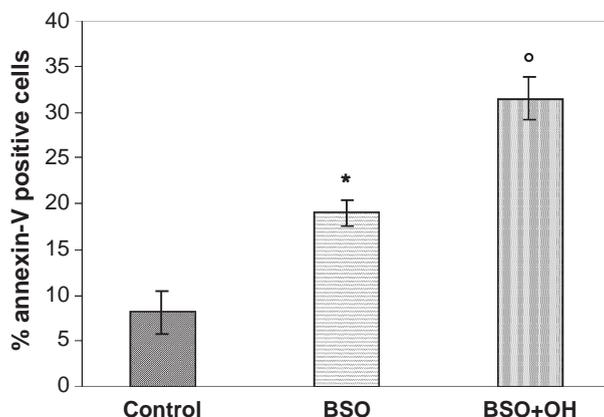


Fig. 3. Effect of glutathione depletion on hepatocyte apoptosis. Rat hepatocytes were treated with BSO 2 mM during 6 h. In other instances hepatocytes were then treated with EtOH 50 mM. Apoptosis was determined as described in Materials and methods. Values represent mean \pm S.E. for three independent experiments carried out in triplicate. * Significantly different from control ($p < 0.05$).

IL-10 and apoptosis pathway

144

When primary cultured rat hepatocytes were treated with IL-10 before exposure to EtOH or BSO/ EtOH, there were not significant differences in active caspase-3, mitochondrial membrane disruption and bax expression (data not shown).

145

146

147

NF- κ B and apoptosis

148

Rat hepatocytes were exposed to IL-10 at different intervals ranging from 30 to 240 minutes. Nuclear extracts were prepared and analyzed by EMSA showing that IL-10 prevented the activation of NF- κ B

149

150

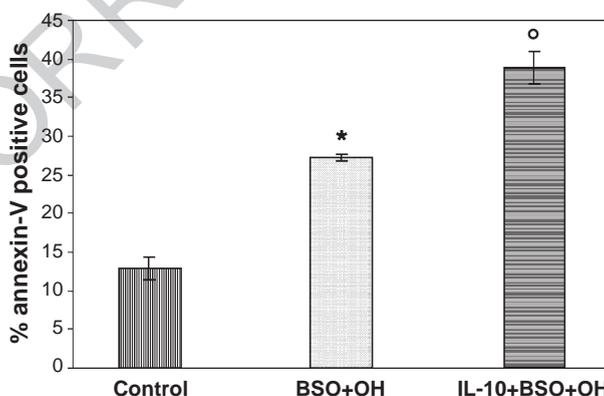


Fig. 4. Effect of glutathione depletion and ethanol on annexin-V binding. Rat hepatocytes were pretreated with BSO 2 mM and then treated with EtOH 50 mM. To evaluate IL-10 (10 ng/ml) effect, cells were pretreated for 6 h before exposure. Annexin-V binding was determined as described in Materials and methods. Values represent mean \pm S.E. for three independent experiments carried out in triplicate. * Significantly different from control ($p < 0.05$). ° Significantly different from BSO/OH treated cells ($p < 0.05$).

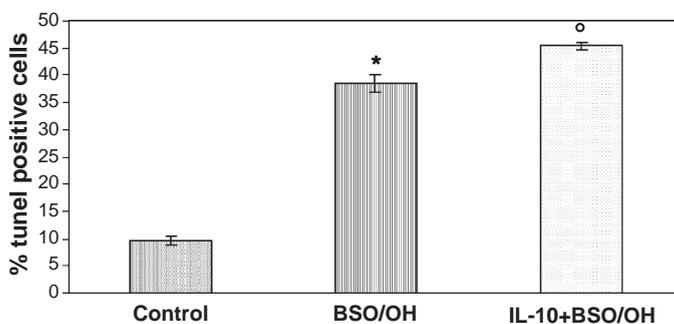


Fig. 5. Effect of glutathione depletion and ethanol on TUNEL staining. Rat hepatocytes were pretreated with BSO 2 mM and then treated with OH 50 mM. To evaluate IL-10 (10 ng/ml) effect, cells were pretreated for 6 h before exposure. TUNEL staining was determined as described in Materials and methods. Values represent mean \pm S.E. for three independent experiments carried out in triplicate. * Significantly different from control ($p < 0.05$). ° Significantly different from BSO/OH treated cells ($p < 0.05$).

(Fig. 7) To confirm this finding we examined the levels of I κ B in cellular extracts from hepatocytes by Western Blot. IL-10 did not induce I κ B degradation (Fig. 7). 151

In order to confirm that NF- κ B inhibition led to rat hepatocyte apoptosis, cells were treated with TNF- α and sulfasalazine, a NF- κ B inhibitor. When hepatocytes were solely exposed to TNF- α , there was not apoptosis. Contrary, apoptosis increased 23% with sulfasalazine and TNF- α (Fig. 8). 152
153
154
155

Discussion 156

NF- κ B is an ubiquitous transcription factor that is activated by a variety of cytokines and mitogens, and it is a key regulator involved in the inflammatory response to infection (Roman et al., 2000). The activation of NF- κ B is thought to be part of a stress response as it is activated by a variety of stimuli that include growth factors, cytokines, lymphokines, UV, pharmacological agents, and other stresses. In its inactive form NF- κ B is sequestered in the cytoplasm, bound by members of the I κ B family of inhibitor 157
158
159
160
161

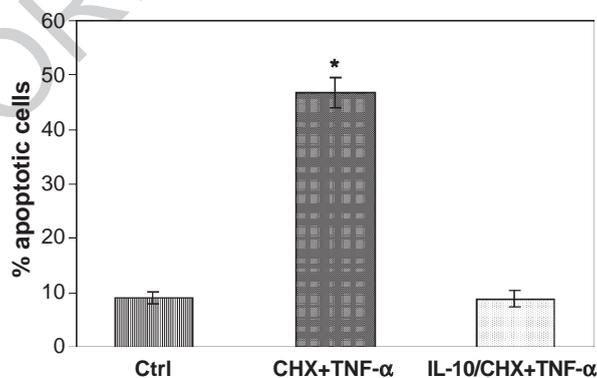


Fig. 6. Apoptosis of HepG2 cells exposed to Cycloheximide(CHX) and TNF- α and pretreated with IL-10. Cells were treated during 1 h with CHX 40 μ M and then exposed to TNF- α (30 ng/ml) for 12 h. To evaluate IL-10 (10 ng/ml) effect, cells were pretreated for 6 h before exposure. Apoptosis was determined as described in Materials and methods. Values represent mean \pm S.E. for three independent experiments carried out in triplicate. * Significantly different from control ($p < 0.05$).

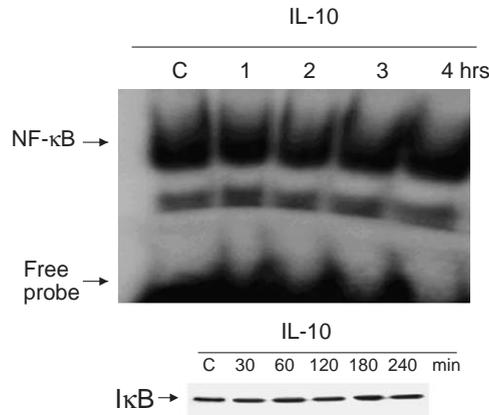


Fig. 7. NF-κB activation and IκB-α time course in isolated rat hepatocytes treated with IL-10. Rat hepatocytes were incubated with IL-10 (10 ng/ml) during 1, 2, 3 and 4 h. Nuclear extracts of rat hepatocytes were prepared and analyzed by EMSA. The image is representative for three independent experiments carried out in triplicate (a). Rat hepatocytes were incubated with IL-10 (10 ng/ml) during 30, 60, 120, 180 and 240 minutes. Cellular extracts were prepared for western blot analyses of IκB-α levels. The image is representative for three independent experiments carried out in triplicate (b).

proteins. The various stimuli that activate NF-κB cause phosphorylation of IκB, which is followed by its ubiquitination and subsequent degradation (Roman et al., 2000; Manna and Aggarwal, 1998). In the present work, we were able to demonstrate that IL-10, an anti-inflammatory cytokine, has a differential effect on NF-κB activation depending of the cell lineage. Indeed, IL-10 increased its activation in human hepatoblastoma cells (Gómez et al., 2004) while it prevented NF-κB activation in rat hepatocytes.

It has been shown that IL10 has diverse and potentially pleiotropic actions (Mocellin et al., 2003; Yeatman et al., 2000) that suggest that it may have a direct effect on apoptosis. IL-10 induces apoptosis in mouse mast cells (Zamorano et al., 2001), human monocytes (Schmidt et al., 2000) and human synoviocytes (Relic et al., 2001), while it has been described to have an inhibitory effect on apoptosis in promyeloid cells (Zhou et al., 2001). The results of the present study indicate that the IL-10 effect on

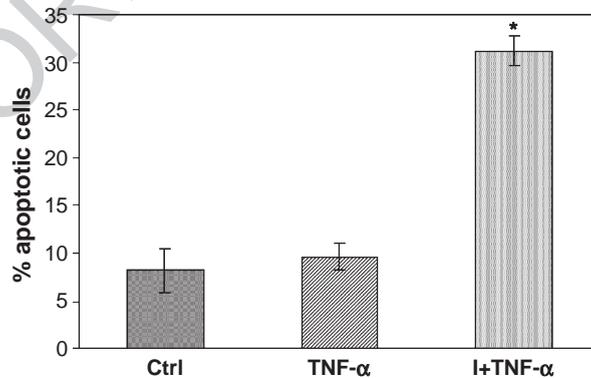


Fig. 8. Apoptosis of hepatocytes exposed to TNF-α. Rat Hepatocytes were treated with TNF-α (30 ng/ml) for 12 h. To evaluate the effect of the NF-κB inhibitor, hepatocytes were pretreated with sulfasalazine 0.5 mM for 1 h. Apoptosis was determined as described in Materials and methods. Values represent mean ± S.E. for three independent experiments carried out in triplicate. * Significantly different from control (p < 0.05).

apoptosis is diverse, depending on the cell lineage, on one hand IL-10 prevented apoptosis induced by CHX/TNF- α in HepG2 cells, while it increased apoptosis induced by ethanol and a glutathione depletor in primary cultured rat hepatocytes. Interestingly in our experiments no significant differences in active caspase-3, mitochondrial membrane disruption and bax expression were found, suggesting an alternative pathway. Based on these findings we propose that IL-10 effect on apoptosis may involve the NF- κ B activation.

It has been established that NF- κ B activation is essential to protect hepatocytes from apoptosis. Using knockout mice for one of the five NF- κ B subunits, RelA, it has been observed that the animals die at day 15 or 16 during embryonic development because of massive liver apoptosis (Doi et al., 1999). Evenmore, pharmacological inhibition of NF- κ B activation also results in the induction of cell death (Hatano and Bremmer, 2001). It has been described that IL-4 protects from apoptosis through cooperation with the NF- κ B family of transcription factors (Zamorano et al., 2001). In order to confirm that the inhibition of NF- κ B activation in rat hepatocytes led to apoptosis, we pre-treated cells with sulphasalazine (a well known NF- κ B inhibitor) and observed an increase in rat hepatocyte apoptosis, endorsing the pertinence of NF- κ B as a safeguard of apoptosis.

Human hepatoma cells are strongly resistant to apoptosis, specially to Fas-mediated apoptosis (Ogawa et al., 2003). Surface expression levels of Fas are relatively low in hepatoma (Yano et al., 1996) and hepatocarcinoma tissues showed significantly less caspase-3 than adjacent non-cancerous liver tissues (Sun et al., 2000). In order to induce apoptosis in HepG2 cells it was necessary in our experiments to pretreat cells with cycloheximide before TNF- α exposure. To attest the certainty of our observations and based on the fact that HepG2 cells are a human hepatoblastoma cell line which maintain several liver functions, but do not express significant amounts of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) which appears to be one of the central pathways by which ethanol generates a state of oxidative stress leading to cell apoptosis (Wu and Cederbaum, 2001), we proceeded to treat the HepG2 cells with ethanol and indeed found no apoptosis.

As evidenced in our results IL-10 promoted rat hepatocyte apoptosis (primary cell cultures), this effect could be of particular interest regarding a possible direct link between apoptosis and fibrosis which has recently emerged (1). It has been proposed that in contrast to physiologic apoptosis, pathologic apoptosis resulting from inflammation and fibrosis, may in turn feedback the injury process. In accordance clearance of apoptotic debris through phagocytosis may directly stimulate fibrogenesis (Fadok et al., 1998; Canbay et al., 2003). Hepatic stellate cells (HSC) express the core machinery to phagocytose apoptotic bodies. Apoptotic body engulfment in HSC stimulates TGF- β expression and induces collagen I, a major constituent of the cirrhotic scar (Lauber et al., 2002). Engulfment of the hepatocyte apoptotic bodies by HSC and Kupffer cells enhances their expression of pro-fibrogenic genes and death ligands. Persistent activation of these cells promotes further hepatocyte apoptosis, which culminates in hepatic inflammation and sustained stellate cell activation (Canbay et al., 2004).

The present study demonstrates the importance of differential cell marking when trying to characterize the effects of cytokines in their contribution to liver cell apoptosis. The study provides insight into the mechanisms by which IL-10 affects apoptosis through a differential effect on NF- κ B activation.

Uncited reference

Roman et al., 1999

Acknowledgements

213

This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. 400200-5-34195. We also thank CONACYT for financial support (No. 152990) to Aida Mariana Santiago Lomelí for her Ph.D. studies.

214

215

216

References

217

218

- Canbay, A., Friedman, S., Gores, G., 2004. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 39, 273–278. 219
- Canbay, A., Taimr, P., Torik, N., Higuchi, H., Friedman, S., Gores, G., 2003. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Laboratory Investigation* 83, 655–663. 220
- Cahill, A., Cunningham, C., Adachi, M., Ishii, H., Bailey, S., 2002. Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 26, 907–915. 222
- Chomczynski, P.A., 1993. Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissues samples. *Biotechniques* 15, 536–537. 224
- Fadok, V., Bratton, D., Konowal, A., Freed, P., et al., 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta. *Journal of Clinical Investigation* 101, 890–898. 226
- Feldstein, A., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Gores, G., 2003. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 125, 437–443. 229
- Fernández-Checa, J., García-Ruiz, C., Ookhtens, M., Kaplowitz, N., 1991. Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol fed rats. *Journal of Clinical Investigation* 87, 397–402. 231
- Gómez, L., Santiago, M., Kershenovich, D., Gutiérrez, C., 2004. Differential modulation of Interleukin 4 and Interleukin 10 in HepG2 cells treated with acetaldehyde. *Liver International* (Article in press). 233
- Haddad, J., Fahlman, C., 2002. Redox and oxidant-mediated regulation of IL-10 an anti-inflammatory, antioxidant cytokine? *Biochemical and Biological Research Communication* 297, 163–176. 235
- Haddad, J., Saade, N., Safieh, B., 2003. Interleukin-10 and the regulation of mitogen activated protein kinases: are these signaling modulates targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cellular Signalling* 15, 255–267. 237
- Hatano, E., Bremmer, D., 2001. Akt protects mouse hepatocytes from TNF- α and fas-mediated apoptosis through NF- κ B activation. *Gastrointestinal and Liver Physiology* 281, G1357. 239
- Henson, P.M., Bratton, D., Fadok, V., 2001. The phosphatidylserine receptor a crucial molecular switch? *Molecular and Cellular Biology* 2, 627–633. 241
- Higuchi, H., Adachi, M., Miura, S., Gores, G., 2001. The mitochondrial permeability transition contributes to acute ethanol induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 34, 320–328. 243
- Lauber, K., Bohn, E., Krober, S., Xia, A., et al., 2002. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3 mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113, 1188–1198. 245
- Manna, S.K., Aggarwal, B.B., 1998. Interleukin-4 down-regulates both forms of tumor necrosis factor receptor and receptor-mediated apoptosis, NF- κ B, AP-1 and c-jun N-terminal kinase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33333–33341. 248
- Miñana, J., Gomez, L., Lloret, A., Pallardo, F., Escudero, A., Sastre, J., 2002. Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology* 35, 1205–1214. 249
- Mocellin, S., Panelli, M.C., Wang, E., 2003. The dual role of IL-10. *Trends in Immunology* 24, 36–43. 251
- Natori, S., Rust, C., Stadheim, L., Srinivasan, A., Gores, G., 2001. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *Journal of Hepatology* 34, 248–253. 252
- Ogawa, K., Yasumura, S., Atarashi, Y., et al., 2003. Sodium butyrate enhances Fas-mediated apoptosis of human hepatoma cells. *Journal of Hepatology* 32, 1178–1185. 254
- Relic, B., Guicheux, J., Mezin, F., Lubberts, E., 2001. IL-4 and IL-13, but not IL-10 protect human synoviocytes from apoptosis. *Journal of Immunology* 166, 2775–2782. 256
- Roman, J., Colell, A., Blasco, C., 1999. Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HepG2 cells: effect on transcription factors AP-1 and NF- κ B. *Hepatology* 30, 1473–1480. 258

- Roman, J., Gimenez, A., Lluís, T., 2000. Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 by acetaldehyde in HEPG2 cell. *Journal of Biological Chemistry* 275, 14684–14690. 260
261
- Sastre, J., Miñana, J., Alguacil, P., Molet, G., Gomez-Cambrotero, L., Viña, J., 1999. Chronic ethanol feeding causes oxidative stress in rat liver mitochondria. *Free Radical Research* 30, 325–327. 262
263
- Savill, J., 2000. Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney and Blood Pressure Research* 23, 173–174. 264
- Schmidt, M., Luger, N., Pavels, H., 2000. IL-10 induces apoptosis in human monocytes involving the CD95 receptor ligand pathway. *European Journal of Immunology* 30, 1769–1777. 265
266
- Sun, B.H., Zhang, J., Wang, B.J., et al., 2000. Analysis of in vitro patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocarcinoma and its relationship to p21 and hepatic apoptosis. *World Journal of Gastroenterology* 6, 356–360. 267
268
- Viña, J., Hem, R., Krebs, H., 1978. Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes. *Biochemical Journal* 170, 627–630. 269
270
- Wajant, H., Scheurich, P., 2001. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *International Journal of Biochemical and Cellular Biology* 33, 19–32. 271
272
- Wu, D., Cederbaum, A., 2001. Removal of glutathione produces apoptosis and necrosis in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 25, 619–628. 273
274
- Yano, H., Fukuda, K., Haramaki, M., et al., 1996. Expression of Fas and anti-Fas mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cell lines. *Journal of Hepatology* 25, 454–464. 275
276
- Yeaman, F., Jacobs, S., Gillespie, S., 2000. Combines Stimulation with the T helper cell type 2 cytokines IL-4 and IL-10 induces mouse mast cell apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 193, 1095–1103. 277
278
- Yoon, J., Gores, G., 2002. Death receptor mediated apoptosis and the liver. *Journal of Hepatology* 37, 400–410. 279
- Zamorano, J., Mora, A., Boothby, M., Keegan, A., 2001. NF-kB activation plays an important role in the IL-4 induced protection from apoptosis. *International Immunology* 13, 1479–1487. 280
281
- Zhou, J., Broussard, S., Strile, K., Freun, G., 2001. IL-10 inhibits apoptosis of promyeloid cells by activating insulin receptor substrate-2 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Immunology* 167, 4436–4442. 282
283
284