PUNTO DE VISTA

Células estrelladas hepáticas y estrés oxidativo

R. Urtasun y N. Nieto

Departamento de Medicina. Unidades de Enfermedades Hepáticas. Mount Sinai School of Medicine. New York, EE.UU.

RESUMEN

La fibrosis hepática ocurre en la lesión hepática crónica y se caracteriza por la producción excesiva y el depósito de componentes de la matriz extracelular (MEC), fundamentalmente de colágeno de tipo I. Las células estrelladas hepáticas (CEH) son las responsables de la producción excesiva de matriz extracelular durante la fibrosis. La activación de las CEH, constituye el paso fundamental del desarrollo de la fibrosis hepática y está mediada por citoquinas específicas y especies reactivas de oxígeno (ERO) que liberan los hepatocitos dañados, las células de Kupffer y las CEH activadas. Aunque las CEH permanecen normalmente en estado quiescente, se activan en respuesta a los factores que promueven la lesión hepática y proliferan y generan matriz. Un rasgo fundamental de la activación de las CEH es la producción incontrolada de colágeno de tipo I con una escasa degradación. El colágeno es una proteína heterotrimérica que se compone de dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, formando una triple hélice. El inicio de la activación de las células estrelladas se debe en gran medida a una estimulación paracrina, mientras que la perpetuación de dicho estado activado implica regulación tanto autocrina como paracrina. Esta revisión trata del papel del estrés oxidativo sobre la activación de las CEH.

Palabras clave: Células estrelladas hepáticas. Fibrosis. Matriz extracelular. Especies reactivas de oxígeno.

ABSTRACT

Hepatic fibrosis is a wound-healing response that takes place during chronic liver injury and is characterized by excessive production and deposition of extracellular matrix (ECM) components, mainly collagen type I. Hepatic stellate cells (HSC) are responsible for the excessive production of scar tissue during liver fibrosis. Activation of HSC, the main step in the development of hepatic fibrosis, is mediated by specific cytokines and reactive oxygen species (ROS) released by damaged hepatocytes and/or activated Kupffer cells and HSC. While HSC usually remain quiescent, in response to factors promoting liver injury they undergo activation and become highly proliferative and fibrogenic. Indeed a key feature of HSC activation is uncontrolled production of collagen type I with very little degradation. Collagen is a heterotrimeric protein composed of two $\alpha 1$ chains and one $\alpha 2$ chain forming a triple helix structure. Initiation of stellate cell activation is largely due to paracrine stimulation, whereas the perpetuation of such activated state involves autocrine as well as paracrine loops. This review focuses on the role of oxidant stress on the activation of stellate cells.

Key words: Hepatic stellate cells. Fibrosis. Extracellular matrix. Reactive oxygen species.

Urtasun R, Nieto N. Células estrelladas hepáticas y estrés oxidativo. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 223-230.

Financiado por la Beca del US *Public Health Service* 1R01 DK 069286-01A1, otorgada por el *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (N. N.), y por una beca de investigación de corto plazo de la Universidad Pública de Navarra, España (UE).

Recibido: 08-01-07.

Aceptado: 09-01-07.

Correspondencia: Natalia Nieto. Department of Medicine. Division of Liver Diseases. Mount Sinai School of Medicine. Box 1123. 1425 Madison Avenue. Room 11-76. New York. New York 10029, USA. Fax: 1-212-849-2574. e-mail: natalia.nieto@mssm.edu

ABREVIATURAS (por orden no alfabético)

Hepatopatía alcohólica (HA); ácido araquidónico (AA); promotor del colágeno $\alpha 1(I)$ (*COL1A1*); promotor del colágeno $\alpha 2(I)$ (*COL1A2*); ciclooxigenasa (COX); matriz extracelular (MEC); 4-hidroxihexenal (4-HHE); 4-hidroxinonenal (4-HNE); células estrelladas hepáticas (CEH); citocromo P₄₅₀ 2E1 (CYP2E1); factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); prostaglandina E₂ (PGE₂); ácidos grasos poliinsaturados (AGP); especies

reactivas de oxígeno (ERO); anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$); factor de crecimiento transformador β (TGF- β); factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

ESTRÉS OXIDATIVO

La generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) por el metabolismo del alcohol se ha postulado como uno de los mecanismos principales de la hepatopatía alcohólica (1). Las ERO se consideran hepatotóxicas por su capacidad de reaccionar con la mayoría de las macromoléculas, inactivando enzimas, dañando el ADN, produciendo modificaciones post-traduccionales e induciendo reacciones de peroxidación de lípidos, lo que rompe las membranas biológicas (2).

Entre las diferentes fuentes de ERO en la célula se encuentran las mitocondrias, los citocromos P450, la NADPH-oxidasa y la xantina-oxidasa, y las enzimas implicadas en las rutas metabólicas del ácido araquidónico, como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa (COX) (3-5). Una de las fuentes principales de producción de ERO en la célula es la cadena respiratoria mitocondrial, que emplea aproximadamente el 80-90% del O_2 consumido por el ser humano (6). Aunque sólo un pequeño porcentaje del O_2 se convierte en ERO, la cadena respiratoria mitocondrial genera la mayoría de las ERO que produce el organismo.

Otra de las grandes fuentes de ERO, especialmente en el hígado, son las oxidases de función mixta del citocromo P450 (7). Algunas de las enzimas del citocromo P450 también son importantes para metabolizar sustratos normalmente presentes en el organismo, como ácidos grasos, colesterol, esteroides y ácidos biliares (8). Las reacciones bioquímicas catalizadas por las moléculas del citocromo P450 emplean O_2 , generándose durante estas reacciones cantidades pequeñas de ERO; sin embargo, el grado de generación de ERO puede variar considerablemente dependiendo del metabolito degradado y de la molécula del citocromo P450 implicada (9).

La isoforma 2E1 del citocromo P450 (CYP2E1) es especialmente activa en la producción de ERO, ya que es una proteína desacoplada que genera ERO incluso en ausencia de sustrato añadido (10-12). Esta enzima tiene especial interés para el desarrollo de la hepatopatía alcohólica, pues su actividad aumenta después del consumo de alcohol (13); el CYP2E1 es además estabilizado por el propio alcohol (14), y el alcohol se metaboliza por el CYP2E1 (10,15).

La xantina-oxidasa también produce ERO (12). En condiciones fisiológicas normales, la xantina-oxidasa actúa como una deshidrogenasa que elimina un hidrógeno de la xantina o la hipoxantina y lo transfiere al NAD para producir NADH. Sin embargo, en ciertas condiciones, como en las alteraciones del flujo sanguíneo y el consumo de alcohol, la xantina-deshidrogenasa se convierte en una oxidasa productora de ERO (16), potenciando así el

estrés oxidativo. Otras fuentes de ERO en el organismo son los macrófagos y los neutrófilos (17). Ambos expresan NADPH-oxidasa, que genera $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 cuando se activa.

El estrés oxidativo refleja normalmente el equilibrio entre la velocidad de producción y de eliminación de ERO, y la posterior reparación de las macromoléculas y membranas celulares dañadas (18). Existen mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que protegen a las células frente a las ERO. Entre ellos están: a) las superóxido-dismutasas (SOD1 y SOD2), que dismutan el $O_2^{\cdot-}$ y lo convierten en H_2O_2 y O_2 ; b) la catalasa y la glutatión-peroxidasa, que descomponen el H_2O_2 ; c) las glutatión-S-transferasas, que pueden eliminar los intermediarios reactivos y los aldehídos lipídicos; d) las metalotioneínas, las hemo-oxigenasas, las tioredoxinas, la ceruloplasmina y la ferritina, que ayudan a eliminar metales tales como el hierro, que promueve las reacciones oxidativas; y e) antioxidantes no enzimáticos y de bajo peso molecular como el glutatión, las vitaminas A, C y E, la ubiquinona, el ácido úrico y la bilirrubina (19,20).

ACTIVACIÓN DE CÉLULAS ESTRELLADAS Y FIBROSIS HEPÁTICA

Las CEH han sido el principal objetivo en el intento de identificar el origen de la MEC, pues se activan durante lesiones hepáticas de etiologías muy diferentes (21). Su activación se caracteriza por la aparición de un fenotipo proliferativo, contráctil, migratorio, fibrogénico e inflamatorio (22) (Fig. 1).

Estudios recientes han subrayado la heterogeneidad de las poblaciones mesenquimatosas del hígado, desde las CEH clásicas hasta los fibroblastos portales, con la expresión variable de marcadores neurales, angiogénicos, contráctiles e incluso derivados de la médula ósea (23). Es más, el marcaje genético experimental de las CEH, mediante la expresión de proteínas fluorescentes unidas a los promotores de genes fibrogénicos o contráctiles, ilustra la plasticidad de las poblaciones de células fibrogénicas *in vivo* (24). En vista de esta capacidad de transdiferenciación entre las poblaciones de células mesenquimatosas y, posiblemente, incluso de células epiteliales, la cuestión no es necesariamente de dónde surgen las células fibrogénicas, sino más bien si estas expresan *in vivo* dianas moleculares tales como receptores o citoquinas en concentraciones suficientes como para ser objeto de agentes diagnósticos o compuestos antifibróticos (25).

Las CEH se activan tras lesiones hepáticas de diferente etiología, sufriendo una transición de células quiescentes a miofibroblastos proliferativos, fibrogénicos y contráctiles (26). Los primeros cambios corresponden a la llamada "iniciación", ya que las de la expresión génica y del fenotipo que hacen que las células se vuelvan sensibles a las

Fig. 1. CEH primarias aisladas de ratas control. Estas microfotografías ópticas se tomaron los días 0 (A) y 6 (B) (200x).

citoquinas y las ERO (26). Ello se debe a una estimulación paracrina causada por los efectos rápidos y desorganizativos de la lesión hepática sobre la homeostasis de las células vecinas y a los primeros cambios de la MEC (27,28). Los estímulos que inician la activación de las CEH proceden principalmente de los hepatocitos dañados, las células de Kupffer y las células endoteliales, además de alteraciones rápidas en la composición de la MEC (27,28).

Los hepatocitos y las células de Kupffer son una gran fuente de ERO y de especies reactivas de nitrógeno, que estimulan de forma paracrina a las CEH (27-31). Además, su actividad se magnifica *in vivo* por la depleción de antioxidantes como ocurre en las hepatopatías (32). Las células de Kupffer producen citoquinas y factores de crecimiento, moléculas clave que participan en la activación de las CEH (33). Las células endoteliales desempeñan un papel doble en la fase inicial de la activación de las CEH: la lesión de las células endoteliales del sinusoide hepático estimula la producción de una variante de la fibronectina celular que posee efectos activadores sobre las CEH (34). Las células endoteliales convierten también el TGF β latente en la forma fibrogénica activa a través de la activación de la plasmina (35).

La perpetuación de la activación de las CEH implica sucesos celulares que amplifican el fenotipo activado potenciando la expresión y la reactividad de las citoquinas y el remodelado acelerado de la MEC (26,36,37). La elevada respuesta a citoquinas se produce debido a la expresión aumentada de receptores de membrana celular y por tanto a una mayor señalización (35,38). Los receptores tipo tirosina-quinasas mediadores de muchas de las respuestas de las CEH están aumentadas en la hepatopatía alcohólica (39). El constante remodelado de la MEC durante esta fase constituye la base de la mayoría de las lesiones fibrogénicas. La matriz subendotelial, de baja densidad, se ve progresivamente sustituida por otra rica en

colágeno formador de fibras. Esta alteración fundamental de la composición de la MEC afecta al comportamiento de los hepatocitos, las células endoteliales, las células de Kupffer y las CEH (26,29,40).

ESTRÉS OXIDATIVO Y ACUMULACIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR

La síntesis hepática de MEC se asocia normalmente con las CEH activadas. Además, al progresar la respuesta fibrogénica también pueden ocurrir cambios cualitativos y cuantitativos en la MEC, ya que las CEH no sólo sintetizan nuevas proteínas de la MEC, sino que también producen metaloproteinasas, lo que lleva a la desorganización de la matriz fisiológica normal (41-45).

En cuanto a la síntesis de MEC dependiente de las CEH, el análisis detallado de los distintos mediadores y de sus fuentes ha ilustrado el papel fundamental de las células mesenquimatosas en la expresión de TGF β 1 y otras citoquinas fibrogénicas (46). En la primera fase inicial de la fibrogenesis el PDGF y el TGF β 1 producidos por las células de Kupffer, las células endoteliales y los hepatocitos, ejercen una regulación paracrina sobre las CEH (37). Si el proceso fibrótico se sostiene, las CEH pueden sintetizar tales mediadores, manteniendo y amplificando su propia actividad fibrogénica a través de una regulación autocrina.

Publicaciones recientes implican al H₂O₂ en la inducción del promotor de *COL1A1* bajo el tratamiento con TGF β (47,48). Así, va cobrando importancia la idea de que tanto la expresión como la actividad de determinadas citoquinas profibrogénicas se ven significativamente moduladas por reacciones dependientes de las ERO (47,48). En la respuesta profibrogénica también intervienen reacciones derivadas de la peroxidación lipídica (28-30) y el acetaldehído tiene acciones profibrogénicas (49,50). Las

ERO (H_2O_2) y los productos de la peroxidación lipídica 4[hidroxi-2,3-nonenal (4-HNE), 4-hidroxi-hexenal (4-HHE), malondialdehído (MDA)] pueden difundir fácilmente a través de la membrana plasmática (51,52); por tanto, es probable que las ERO y los productos difusibles derivados de la POL, y no sólo las citoquinas y factores de crecimiento, puedan actuar sobre las CEH *in vivo* para inducir la respuesta fibrogénica (28,30,32,53). Es más, los trabajos de Jezequel's y cols. (32) aportan pruebas a favor, indicando una mayor proliferación y síntesis de colágeno de tipo I en las CEH de rata cultivadas en un medio condicionado derivado de hepatocitos sometidos a peroxidación lipídica simulada, y los trabajos de Nieto y cols. (28,54) muestran que las células HepG2 que sobreexpresan CYP2E1 liberan ERO derivadas del metabolismo de la CYP2E1, que actúan sobre las CEH desencadenando su activación, proliferación y respuesta profibrogénica según puede medirse por la expresión de actina α del músculo liso y de colágeno de tipo I, y por la tasa de incorporación de *metil*[3H]-timidina en el ADN de las CEH (28,54).

La señalización de las ERO derivadas del CYP2E1 que desencadenan la activación de las CEH podría intervenir en la lesión hepática y la fibrosis inducidas por el alcohol (27,28). Asimismo, estudios recientes que han empleado células de Kupffer primarias en cocultivo con CEH han demostrado un mecanismo profibrogénico por el que el H_2O_2 derivado de las células de Kupffer podría regular al alza la transactivación de *COL1A1* y *COL1A2*, evitando al mismo tiempo la degradación proteica del colágeno de tipo I a través de un mecanismo dependiente de la IL-6 (53).

EFFECTOS PARACRINOS SOBRE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS

Efecto paracrino de los hepatocitos

Existe considerable interés en el papel que desempeñan el estrés oxidativo y la generación de ERO en el mecanismo por el que el etanol resulta hepatotóxico (55). Uno de los avances principales ha sido el desarrollo del modelo de administración intragástrica de etanol, en el que se produce la inducción del CYP2E1 junto con una lesión hepática (56,57). En este modelo, la patología hepática inducida por el etanol se correlaciona con los niveles de CYP2E1 y la peroxidación lipídica elevada (58). Comprender cómo estimula el estrés oxidativo derivado del CYP2E1 estimula la respuesta fibrótica en el hígado podría tener valor a la hora de paliar algunos de los efectos tóxicos del alcohol.

El metabolismo del alcohol a través del CYP2E1 lleva a la producción de ERO y de productos finales de la peroxidación lipídica (58,59). El acetaldehído, las ERO y los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga pueden ac-

tivar las CEH de manera paracrina (27,28). El acetaldehído induce *COL1A1* y *COL1A2* a través de un mecanismo dependiente de $TGF\beta$ (49,60). El $TGF\beta$ se considera la citoquina profibrogénica más potente (35,61). La $TGF\beta$ bloquea la proliferación de los hepatocitos, estimula la activación de CEH, promueve la producción de MEC y media en la apoptosis de los hepatocitos (62). Las ERO, los productos de la peroxidación lipídica MDA, 4-HNE y 4-HHE pueden aumentar la producción de colágeno de tipo I en las CEH (29,63). Las ERO modulan también la unión de los factores de transcripción (p. ej., c-Jun/AP1, NFkB, Sp1 y Smads) modulando la transactivación de *COL1A1* y *COL1A2* en las CEH (63).

La proliferación de CEH y la síntesis de colágeno mediada por productos liberados por los hepatocitos es una de las principales hipótesis que explican la fibrosis en conexión con el hierro y el alcohol (64,65). Varios estudios han evaluado el papel del medio condicionado por los hepatocitos en la estimulación de las CEH. Chen y cols. (66) hallaron un efecto inhibitorio del medio procedente de hepatocitos murinos sobre la proliferación de las CEH; Gressner y cols. (37) mostraron una fuerte estimulación de la proliferación de CEH en un suero bovino fetal (SBF) al 0,2% durante el cocultivo de 48 horas con células parenquimatosas, de hepatoma de rata y de hepatoma humano. Faouzi y cols. (67) hallaron que el medio tumoral condicionado por hepatocitos de rata induce la activación de las CEH de rata en cultivo, y Hu y cols. (68,69) mostraron que el medio condicionado por hepatocitos tratados con CCl_4 induce la activación de las CEH. En cocultivos de hepatocitos recién aislados y una línea de CEH, el etanol indujo el ARNm de *COL1A1* de forma dependiente de la dosis y del tiempo a través de su metabolismo por la alcohol-deshidrogenasa (70).

Efecto paracrino de las células de Kupffer

Las células de Kupffer son macrófagos residentes en el hígado y suponen el 70-80% de todos los macrófagos del organismo. Representan la primera línea de defensa de este órgano que recibe sangre arterial y esplácnica rica en nutrientes. Suponen un mecanismo defensivo frente a los microorganismos invasores y funcionan como punto principal de eliminación de endotoxinas (71). Liberan una amplia gama de mediadores solubles, como especies reactivas tales como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y óxido nítrico, citoquinas, quimoquinas, factores de crecimiento, ciclooxigenasa y metabolitos de la lipooxigenasa, todos los cuales ejercen efectos paracrinicos esenciales y fisiológicamente diversos sobre todos los demás tipos de células hepáticas (72,73).

Las células de Kupffer son también fundamentales para la respuesta homeostática hepática frente a las lesiones. Al sufrir los hepatocitos cambios degenerativos, las células de Kupffer responden inmediatamente

y liberan mediadores de la respuesta inflamatoria y reparadora (74). El TNF α liberado por las células de Kupffer, junto con otras citoquinas y mediadores desconocidos, estimulan en las CEH la expresión de MMP capaces de degradar la matriz perisinusoidal, permitiendo así la migración y proliferación de las CEH en preparación para la generación de la matriz extracelular (75). De esta manera, la respuesta homeostática es iniciada a nivel celular por mediadores procedentes de las células de Kupffer, sirviendo de base a los mecanismos defensores y reparadores hepáticos frente a la lesión (76).

El influjo de las células de Kupffer coincide con la aparición de marcadores de activación de las CEH (p. ej., PDGFR β y actina α de músculo liso) (77). Las células de Kupffer pueden estimular la síntesis de matriz, la proliferación celular y la liberación de retinoides por las CEH mediante la acción de las citoquinas y las especies reactivas (78). También pueden influir en las CEH a través de la secreción de MMP-9, que puede activar el TGF β 1 latente y estimular la síntesis de colágeno I (79). Por último, las células de Kupffer generan ERO a través de la NADPH-oxidasa, la xantina-oxidasa, las mitocondrias o posiblemente el CYP2E1, lo que a su vez puede potenciar la activación de las CEH y la síntesis de colágeno I (80).

Estos efectos aumentan bajo el tratamiento con etanol, debiendo considerarse como componente crítico el papel de los ácidos grasos poliinsaturados, cuyo efecto se ha visto en varios modelos de administración de etanol *in vitro* e *in vivo* (81). Las células de Kupffer producen también óxido nítrico, que puede contrarrestar los efectos estimuladores de las ERO reduciendo la proliferación, la contractilidad y la producción de colágeno I de las CEH; sin embargo, el óxido nítrico puede también reaccionar con el O $_2^{\cdot-}$ generando peroxinitrito (ONOO $^-$), cuyos posibles efectos sobre la producción de colágeno I por las CEH se desconocen y merece la pena explorar. El TNF α actúa como antifibrogénico, regulando a la baja la activación del promotor del gen del colágeno I (82). Las células de Kupffer se activan por diversos estímulos –como el zimosán opsonizado, los ésteres de forbol, la endotoxina y los ionóforos de calcio– para liberar ERO (83).

El efecto de la endotoxina sobre la biología de las células de Kupffer es un acontecimiento clave en la patogénesis de la fibrogénesis hepática (84). En las células de Kupffer, el O $_2^{\cdot-}$ se produce también durante la generación de estrés oxidativo en la fagocitosis (31). Una oxidasa de la explosión respiratoria de la membrana cataliza la reducción monoelectrónica del O $_2$ en O $_2^{\cdot-}$ a expensas de la forma reducida del NADPH (85). Otra especie radical, el óxido nítrico, se produce en las células de Kupffer a partir de la L-arginina por la catálisis de la óxido nítrico-sintasa tras un conjunto de estímulos diferente, incluidos la endotoxina y la adición combinada de PGE $_2$ y TNF α (86). Tanto el O $_2^{\cdot-}$ como el óxido nítrico poseen un importante potencial citotóxico. En condiciones normales, las células de Kupffer tienen una capacidad limitada de pro-

ducir especies reactivas. Sin embargo, después de su estimulación por citoquinas, aumentan las especies reactivas, que incrementan durante la actividad fagocítica (87).

Mientras que los hepatocitos han sido el objeto central de la mayoría de los estudios que han investigado los efectos del etanol sobre la función hepática y sobre la activación de las CEH (76,88), varios trabajos han demostrado que las células de Kupffer producen mediadores que estimulan el metabolismo del etanol e inician las primeras fases de la lesión hepática inducida por etanol (89). La cascada de acontecimientos que conduce a la hepatotoxicidad mediada por el alcohol se inicia por un aumento de la llegada de endotoxina desde el intestino, que activa las células de Kupffer para que liberen radicales de oxígeno, factores de crecimiento, citoquinas, óxido nítrico y prostaglandinas, que o son hepatotóxicas o sirven de quimioatrayentes para los neutrófilos citotóxicos que invaden el hígado (90). Posteriormente aparece hipoxia en las regiones pericentrales del lobulillo hepático, donde se forman radicales libres tóxicos al reaparecer el oxígeno, lo que provoca la muerte celular (91,92).

Ácidos grasos poliinsaturados y activación de las CEH

Además de los efectos del metabolismo del alcohol, la grasa de la dieta se considera un factor que contribuye a la gravedad de la hepatopatía alcohólica. En los modelos animales, las dietas que contienen ácidos grasos poliinsaturados (AGP) aumentan el potencial tóxico del etanol (93). El ácido araquidónico (AA) (un AGP de la serie n-6), como componente de las membranas celulares, es una de las dianas de la autooxidación y puede subir la peroxidación lipídica (94,95); los productos derivados de la peroxidación lipídica, como el MDA y el 4-HNE, pueden aumentar la expresión de colágeno I (27-29). Por otra parte, las vías metabólicas del AA llevan a producir prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que también pueden causar una respuesta fibrogénica por su potencial de inducir reacciones dependientes del estrés oxidativo (29).

Se han desarrollado modelos de cultivo celular para explorar las relaciones entre etanol, AA y CYP2E1 en la mediación de las lesiones celulares hepáticas por estrés oxidativo. Sobreexpresando CYP2E1 en las células HepG2, por ejemplo, el AA puede producir toxicidad dependiente del estrés oxidativo (59,96). El AA estimula la proliferación y la expresión de colágeno I en las CEH cultivadas junto con HepG2 transfectadas con células HepG2 o hepatocitos que expresen CYP2E1 (29).

La proliferación de las células estrelladas, los cambios morfológicos, la pérdida de gotas lipídicas, el aumento de la actina α de músculo liso, la elevación del colágeno I intracelular y secretado y de proteínas laminina I, y el aumento del H $_2$ O $_2$ intra- y extracelular y de los productos de la peroxidación lipídica fueron más claros en las CEH

cultivadas junto con células que expresaban CYP2E1 que en las CEH cultivadas solas (27,30). Parecen ser que el H₂O₂ desempeña un papel crítico en el aumento de la expresión de *COLIA2* por el etanol y el AA; además, la COX-2 media la inducción de la expresión de *COLIA2* por AA. Estos efectos se evitaron mediante antioxidantes e inhibidores de la CYP2E1, lo que indica que las ERO derivadas de los hepatocitos intervienen en la activación de las CEH (28,30).

Mientras que se han realizado muchos estudios con AGP de la serie n-6, se sabe menos del papel que desempeñan los AGP de la serie n-3 en el desarrollo de la hepatopatía alcohólica. La administración de AGP n-3 podría tener el inconveniente de inducir reacciones de POL con el consiguiente aumento del colágeno I. Múltiples estudios han señalado que la POL desempeña un papel importante en la patogenia de la hepatopatía alcohólica (97,98). El 4-HHE y el 4-HNE son los principales aldehídos que produce la peroxidación microsomal de los AGP n-3 y n-6, respectivamente, ambos presentes en el aceite de pescado (AP) (99). Son muy tóxicos y se ha visto en experimentos *in vivo* e *in vitro* que inhiben las funciones biológicas de los microsomas hepáticos y las mitocondrias de la rata, y que alteran la estructura de las membranas del hígado de la rata (100). Un estudio reciente analizó los posibles mecanismos por los que la coadministración de una dieta enriquecida con AP (AGP de la serie n-3), que generó abundantes productos de POL (es decir, 4-HHN y 4-HNE), más etanol podría aumentar el depósito de colágeno I (101). Estos estudios señalaron que el aceite de pescado puede tener un efecto sinérgico con el etanol e inducir el colágeno I, transactivando el promotor de *COLIA2* a través de un mecanismo de tipo peroxidación lipídica-PKC-PI3K-Akt-NFκB en ausencia de esteatosis e inflamación.

BIBLIOGRAFÍA

- Cederbaum AI. Ethanol-related cytotoxicity catalyzed by CYP2E1-dependent generation of reactive oxygen intermediates in transduced HepG2 cells. *Biofactors* 1998; 8: 93-6.
- Biernert GP SJ, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 994-1003.
- Kaplowitz N. Drug-induced liver injury. *Clin Infect Dis* 2004; 38: S44-48.
- Han D, Matsumaru K, Rettori D, Kaplowitz N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 439-51.
- Blokhina O VE, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 2003; 91: 179-94.
- Adam-Vizi V CC. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 639-45.
- Jezek P HL. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 2478-503.
- Venkatakrishnan K VML, Greenblatt DJ. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of *in vitro* models. *J Clin Pharmacol* 2001; 41: 1149-79.
- Shewetta. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr Drug Metab* 2000; 1: 107-32.
- Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 27-42.
- Cederbaum AI, Wu D, Mari M, Bai J. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1539-43.
- Wu D, Cederbaum A. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 277-84.
- Jiménez-López J, Cederbaum AI. CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity: role in ethanol-induced liver injury. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 1: 671-85.
- Roberts B, Song BJ, Soh Y, Park SS, Shoaf SE. Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *J Biol Chem* 1995; 270: 29632-5.
- Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997; 257: 59-84.
- Sultatos LG. Effects of acute ethanol administration on the hepatic xanthine dehydrogenase/ xanthine oxidase system in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental* 1988; 246: 946-9.
- Rosen G, Pon S, Ramos C, et al. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB Journal* 1995; 9: 200-9.
- Kessova I, Cederbaum AI. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 509-18.
- Fernández-Checa JC, Colell A, García-Ruiz C. S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial reduced glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002; 27: 179-83.
- Fernández-Checa JC. Alcohol-induced liver disease: when fat and oxidative stress meet. *Ann Hepatol* 2003; 2: 69-75.
- Sarem M, Znaidak R, Macías M, Rey R. Hepatic stellate cell: it is role in normal and pathological conditions. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 93-101.
- Gaca MD. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated. *J Hepatol* 2002; 36: 362-9.
- Baba SFH, Ikai I. Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J Hepatol* 2004; 40: 331-4.
- Magness ST, Bataller R, Yang L, Brenner DA. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology* 2004.
- Ong S. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. *Biomaterials* 2006; 27: 4087-97.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-50.
- Nieto N, Friedman SL, Greenwel P, Cederbaum AI. CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 30: 987-96.
- Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002; 35: 62-73.
- Nieto N, Greenwel P, Friedman SL, Zhang F, Dannenberg AJ, Cederbaum AI. Ethanol and arachidonic acid increase alpha 2(I) collagen expression in rat hepatic stellate cells overexpressing cytochrome P450 2E1. Role of H₂O₂ and cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 20136-45.
- Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 9853-64.
- Cubero F, Nieto N. Kupffer cells and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 674-84.
- Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, Di Sario A, Salzano R, et al. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998; 27: 720-6.
- Tsukamoto H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 911-6.
- Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliensky VE, Wang SS, Bissell DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol* 1994; 127: 2037-48.
- Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 129-40.
- Reeves HL, Dack CL, Peak M, Burt AD, Day CP. Stress-activated

- protein kinases in the activation of rat hepatic stellate cells in culture. *J Hepatol* 2000; 32: 465-72.
37. Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995; 22: 28-36.
 38. Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998; 18: 2-13.
 39. Ankoma-Sey V, Matli M, Chang KB, Lalazar A, Donner DB, Wong L, et al. Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 1998; 17: 115-21.
 40. Nieto N, Domínguez-Rosales JA, Fontana L, Salazar A, Armendariz-Borunda J, Greenwel P, et al. Rat hepatic stellate cells contribute to the acute-phase response with increased expression of alpha1(I) and alpha1(IV) collagens, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and matrix-metalloproteinase-2 messenger RNAs. *Hepatology* 2001; 33: 597-607.
 41. Giuseppe P. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* 2000; 21: 49-98.
 42. Zhou X, Jamil A, Nash A, Benyon RC. Impaired proteolysis of collagen I inhibits proliferation of hepatic stellate cells: Implications for regulation of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2006; 23.
 43. Arthur MJ. Matrix degradation in liver: a role in injury and repair. *Hepatology* 1997; 26: 1069-71.
 44. Arthur MJ. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion* 1998; 59: 376-80.
 45. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G245-249.
 46. Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, Singer MV, Dooley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 57-66.
 47. Garcia-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana L, Dominguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-Pinedo A, et al. Transforming growth factor beta1 induces the expression of alpha1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPbeta-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29: 960-70.
 48. Greenwel P, Tanaka S, Penkov D, Zhang W, Olive M, Moll J, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits type I collagen synthesis through repressive CCAAT/enhancer-binding proteins. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 912-8.
 49. Svegliati-Baroni G, Inagaki Y, Rincón-Sánchez AR, Else C, Saccomanno S, Benedetti A, et al. Early response of alpha2(I) collagen to acetaldehyde in human hepatic stellate cells is TGF-beta independent. *Hepatology* 2005; 42: 343-52.
 50. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Saccomanno S, Bendia E, Benedetti A, et al. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001; 33: 1130-40.
 51. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000; 21: 49-98.
 52. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.
 53. Nieto N. Oxidative-Stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer cells on stellate cells. *Hepatology* 2006; 44: 1487-501.
 54. Nieto N, Cederbaum AI. Increased Sp1-dependent transactivation of the LAMgamma 1 promoter in hepatic stellate cells co-cultured with HepG2 cells overexpressing cytochrome P450 2E1. *J Biol Chem* 2003; 278: 15360-72.
 55. Sampey B, Stewart BJ, Petersen DR. Ethanol-induced modulation of hepatocellular extracellular signal-regulated kinase-1/2 activity via 4-hydroxynonenal. *J Biol Chem* 2006.
 56. French SW, Miyamoto K, Tsukamoto H. Ethanol-induced hepatic fibrosis in the rat: role of the amount of dietary fat. *Alcohol Clin Exp Res* 1986; 10: 13S-19S.
 57. French SW. Intragastric ethanol infusion model for cellular and molecular studies of alcoholic liver disease. *J Biomed Sci* 2001; 8: 20-7.
 58. Ekstrom G, Ingelman-Sundberg M. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1313-9.
 59. Chen Q, Galleano M, Cederbaum AI. Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1. *J Biol Chem* 1997; 272: 14532-41.
 60. Chen A. Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta 1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells. *Biochem J* 2002; 15: 683-93.
 61. Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, et al. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000; 106: 867-72.
 62. Traister A, Breitman I, Bar-Lev E, Zvibel I, Harel A, Halpem Z, et al. Nicotinamide induces apoptosis and reduces collagen I and pro-inflammatory cytokines expression in rat hepatic stellate cells. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1226-34.
 63. Bedossa P, Hougum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology* 1994; 19: 1262-71.
 64. Tavill A, Sharma B, Bacon BR. Iron and the liver: genetic hemochromatosis and other hepatic iron overload disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 526: 179-84.
 65. Reeves H, Burt AD, Wood S, Day CP. Hepatic stellate cell activation occurs in the absence of hepatitis in alcoholic liver disease and correlates with the severity of steatosis. *J Hepatol* 1996; 25: 677-83.
 66. Chen A, Davis BH. The DNA binding protein BTEB mediates acetaldehyde-induced, jun N-terminal kinase-dependent alpha1(I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2818-26.
 67. Faouzi S, Lepreux S, Bedin C. Activation of cultured rat hepatic stellate cells by tumoral hepatocytes. *Lab Invest* 1999; 79: 485-93.
 68. Greenwel P, Dominguez-Rosales JA, Mavi G, Rivas-Estilla AM, Rojkind M. Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited alpha1(I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; 31: 109-16.
 69. Hu Y. Effects of carbon tetrachloride-injured hepatocytes on hepatic stellate cell activation and salivianic acid A preventive action in vitro. *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chih* 2000; 8: 299-301.
 70. Fontana L. Ethanol induces the expression of alpha 1(I) procollagen mRNA in a co-culture system containing a liver stellate cell-line and freshly isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 1362: 135-44.
 71. Sung J, Costerton JW, Shaffer EA. Defense system in the biliary tract against bacterial infection. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 689-96.
 72. Tsukamoto H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 741-8.
 73. Yamashima S, Takei Y, Ikejima K, Sato N. Ethanol-induced sensitization to endotoxin in kupffer cells is dependent upon oxidative stress. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 246-50.
 74. Thomas P. A peptide sequence on carcinoembryonic antigen binds to a 80KD protein on kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 671-7.
 75. Steer C. Identification of receptors for immunoglobulin and complement on mouse Kupffer cells in vitro. *Gastroenterology* 1978; 75.
 76. Wisse E. Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *J Ultrasound Med* 1974; 46: 499-520.
 77. Tahakara Y, Takahashi M, Kawada N. Gene expression profiles of hepatic cell-types specific marker genes in progression of liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2006; 28: 6473-99.
 78. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 2006; 26: 1175-86.
 79. Planaquama A, Claria J, Miguel R, López-Parra M, Titos E, Masferrer JR, et al. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *Faseb J* 2005; 19: 1120-2.
 80. Koivisto T, Mishin VM, Mak KM, Cohen PA, Lieber CS. Induction of cytochrome P-4502E1 by ethanol in rat Kupffer cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 207-12.
 81. Niemela O, Parkkila S, Bradford B, Iimuro Y, Pasanen M, Thurman RG. Effect of Kupffer cell inactivation on ethanol-induced protein adducts in the liver. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 350-5.
 82. Immenschuh S, Stritzke J, Iwahara S, Ramadori G. Up-regulation of heme-binding protein 23 (HBP23) gene expression by lipopolysac-

- haride is mediated via a nitric oxide-dependent signaling pathway in rat Kupffer cells. *Hepatology* 1999; 30: 118-27.
83. Roland C, Naziruddin B, Mohanakumar T, Flye MW. Gadolinium blocks rat Kupffer cell calcium channels: relevance to calcium-dependent prostaglandin E2 synthesis and septic mortality. *Hepatology* 1999; 29: 756-65.
 84. Zhang X, Yu WP, Gao L, Wei KB, Ju JL, Xu JZ. Effects of lipopolysaccharides stimulated Kupffer cells on activation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 15: 610-3.
 85. Cederbaum AI. Microsomal generation of hydroxyl radicals: its role in microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) activity and requirement for iron. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 492: 35-49.
 86. Thakur V, Pritchard MT, McMullen MR, Wang Q, Nagy LE. Chronic ethanol feeding increases activation of NADPH oxidase by lipopolysaccharide in rat Kupffer cells: role of increased reactive oxygen in LPS-stimulated ERK1/2 activation and TNF- α production. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 1348-56.
 87. Bautista AP. The role of Kupffer cells and reactive oxygen species in hepatic injury during acute and chronic alcohol intoxication. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 255S-259S.
 88. Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 1992; 46: 155-68.
 89. Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases acetaldehyde-induced TNF- α generation in Kupffer cells of ethanol-fed rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299: 459-64.
 90. Nakamura Y, Yokoyama H. Acetaldehyde accumulation suppresses Kupffer cell release of TNF and modifies acute hepatic inflammation in rats. *Journal Gastroenterology* 2004; 39: 140-7.
 91. Arteel GE, Kadiiska MB, Rusyn I, Bradford BU, Mason RP, Raleigh JA, et al. Oxidative stress occurs in perfused rat liver at low oxygen tension by mechanisms involving peroxynitrite. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 708-15.
 92. Enomoto N, Ikejima K, Bradford B, Rivera C, Kono H, Brenner DA, et al. Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology* 1998; 115: 443-51.
 93. Tsukamoto H, Gaal K, French SW. Insights into the pathogenesis of alcoholic liver necrosis and fibrosis: status report. *Hepatology* 1990; 12: 599-608.
 94. Nanji AA, French SW. Dietary linoleic acid is required for development of experimentally induced alcoholic liver injury. *Life Sci* 1989; 44: 223-7.
 95. Nanji AA, Griniuvienė B, Sadrzadeh SM, Levitsky S, McCully JD. Effect of type of dietary fat and ethanol on antioxidant enzyme mRNA induction in rat liver. *J Lipid Res* 1995; 36: 736-44.
 96. Caro AA, Cederbaum AI. Role of calcium and calcium-activated proteases in CYP2E1-dependent toxicity in HEPG2 cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 104-13.
 97. Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, Follansbee MH, Oberley LW, Rahemtulla A, et al. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* 1998; 27.
 98. Aleynik S, Leo MA, Aleynik MK, Lieber CS. Increased circulating products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 192-6.
 99. Guichardant M, Bacot S, Moliere P, Lagarde M. Hydroxy-alkenals from the peroxidation of n-3 and n-6 fatty acids and urinary metabolites. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75: 179-82.
 100. Irwin W, Gaspers LD, Thomas JA. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by aldehydes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 215-9.
 101. Nieto N. Ethanol and fish oil induce NF κ B transactivation of the COL1A2 promoter via a lipid peroxidation driven activation of the PKC-PI3K-AKT Pathway. *Hepatology*; 2006.