

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**"¿ES PENTOXIFILINA UN NUEVO INDUCTOR DE FENOTIPO
M2 DE MACRÓFAGOS EQUINOS?"**

MARÍA CECILIA MONTERO SEPÚLVEDA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOLOGÍA

**Director de Tesis
Prof. Dra. Julia Guerrero
Programa Disciplinario de Fisiología y Biofísica
Instituto de Ciencias Biomédicas-Facultad de Medicina
Universidad de Chile**

2016

A mi amada familia,

*Mis hijas Javiera y Josefa, y a mi marido Claudio Navarro
quienes han sido el soporte indispensable en esta etapa de mi vida.*

A mi Padre,

Silvestre Montero quien siempre me acompaña ...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia por su gran amor reflejado en su apoyo y comprensión incondicional en esta tarea que nos comprometió a todos y que hoy culmina con gran alegría y felicidad.

De manera muy especial quiero agradecer a quien hizo todo esto posible, la Doctora Julia Guerrero quien no sólo fue mi tutora y guía en este proyecto sino que también un ejemplo de vida, entregándome los conocimientos y herramientas necesarias para el desarrollo de esta investigación a través de sus consejos -siempre con una sonrisa y una taza de café- alentándome en cada uno de los pasos realizados y dándome la confianza y la fuerza necesaria para seguir adelante en este nuevo camino.

También a Rosario Flores, por su gran ayuda, su infinita paciencia y bondad para entregarme sus conocimientos en cada uno de los protocolos a seguir dentro del laboratorio y por las charlas en los momentos de descanso.

No pueden quedar atrás los distintos Preparadores de caballos Fina Sangre de Carrera con quienes trabajo y que entendieron la importancia de este Magíster, dándome todas las facilidades para realizarlo.

A todos mi eterna Gritud....

INDICE

Resumen	4
Abstract	6
Introducción	8
Sistema Fagocítico-Mononuclear	10
Monocitos	10
Macrófagos derivados de Monocitos	11
Fenotipos Funcionales de los Macrófagos	13
Fenotipo M1 o Clásico	13
Fenotipo M2 o Alternativo	14
Subtipos M2	16
Vías de transducción	18
Patologías en Equinos	20
Infosura	20
Etiopatogenia	21
Tratamiento	25
Pentoxifilina como estrategia terapéutica	26
Hipótesis.....	30
Objetivo General	30
Objetivos Específicos	30
Material y Método	31
Análisis Estadístico	36
Resultados	37
Discusión	51
Conclusiones	57
Relevancia Clínica	57
Limitaciones del Estudio	58
Proyecciones	58
Bibliografía	59

RESUMEN

Las patologías inflamatorias/infecciosas están frecuentemente asociadas con cambios dinámicos en la activación de macrófagos en las que se modifica el equilibrio entre células M1 y M2 en favor del fenotipo pro-inflamatorio con incremento de la producción de mediadores tales como citoquinas y quimoquinas (11). En los equinos existen dos grandes patologías asociadas con el aumento excesivo de citoquinas inflamatorias secundario a la activación de macrófagos que pueden causar la muerte del ejemplar: Infosura o Laminitis y Síndrome de Abdomen Agudo. Entre los tratamientos propuestos para estas patologías se incluye el uso de Pentoxifilina (PTX), fármaco inhibidor no específico de la fosfodiesterasa, que además tiene propiedades anti-inflamatorias conocidas, pero con mecanismos de acción no bien aclarados.

En esta investigación, nos propusimos evaluar si los efectos anti-inflamatorios de PTX están mediados por la inhibición del fenotipo M1 de los macrófagos o con la capacidad de modificar este fenotipo hacia el fenotipo anti-inflamatorio (M2). Para ello se utilizó células equinas derivadas de PBMC obtenidos de sangre venosa periférica de 4 ejemplares fina sangre de carrera (F.S.C.) clínicamente sanos. Las células equinas fueron estimuladas con LPS (25ng/ml) por y con hIL-4 (20ng/ml) por 18 horas en presencia o no de PTX (250µg/ml por 90 minutos). Posteriormente se cuantificó el contenido celular del mRNA de citoquinas pro- y anti- inflamatorias (TNF- α e IL-10).

Se demostró que células equinas tratadas con LPS, PTX indujo una disminución significativa del mRNA de TNF- α . Interesantemente se observó que en los cultivos de LPS con PTX el contenido del mRNA de IL10 fue significativamente

mayor al observado en presencia de LPS solo. Además, en células equinas cultivadas solo con PTX, se observó un incremento significativo del mRNA de IL10, efecto similar al inducido por hIL4. Así mismo, los cultivos de PTX + hIL4 mostraron que el contenido de IL10 en células equinas fue mayor al observado en los cultivos por separado.

Los resultados aquí obtenidos demuestran por primera vez que PTX inhibe la actividad de macrófagos del fenotipo M1 a la vez que potencia la diferenciación hacia el fenotipo M2, resultando en una posibilidad cierta que el tratamiento con PTX en patologías que cursan con procesos inflamatorios agudos obtiene beneficios tanto por el control de la inflamación aguda como por el favorecer la reparación de los tejidos dañados, restableciendo así el equilibrio entre las células pro- inflamatorias y anti-inflamatorias.

ABSTRACT

Inflammatory / infectious diseases are often associated with dynamic changes in macrophage activation in which the balance between M1 and M2 macrophages is modified in favor of the proinflammatory phenotype with increased production of mediators such as cytokines and chemokines (11) . In horses, there are two major diseases associated with excessive increase of secondary inflammatory cytokine macrophage activation that can cause death: Laminitis and Syndrome or Acute Abdomen. Among the proposed treatments for these conditions the use of pentoxifylline (PTX) is recommended. This is a non-specific phosphodiesterase inhibitor drug, which also has known anti-inflammatory properties, but its mechanisms of action are not well clarified included.

In this research, we decided to evaluate whether the anti-inflammatory effects of PTX are mediated by inhibition of macrophage phenotype M1 or by ability to modify the phenotype to the anti-inflammatory phenotype (M2). For this purpose PBMC equine cells obtained from peripheral venous blood of four healthy thoroughbred (F.S.C.) was used. Monocytes-derived macrophages were stimulated with LPS (25ng / ml) for 18 hours in the presence or absence of PTX (250µg / ml for 90 minutes) and with hIL-4 (20ng/ml) in the presence or absence of PTX (250µg / ml for 90 minutes). Then, the mRNA of pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-10) cell content was quantified.

Our results shown that equine cells cultured with LPS, PTX induced a significant decrease of TNF-α mRNA content. Interestingly, cells cultured with LPS and PTX, the IL-10 mRNA content was significantly greater than with LPS alone.

Furthermore, we observed in equine cells cultured with PTX a significant increase IL-10 mRNA content, it was similar to hIL4 induced.

Likewise, cells cultured in presence of PTX and hIL4 together, IL10 mRNA content was greater than that observed in cultures separately.

Here demonstrated for the first time that PTX inhibits the activity of macrophages phenotype M1 and differentiation towards the M2 phenotype. We postulate that, PTX treatments in equine acute inflammatory pathologies is recommended for its properties to control of acute inflammation and favoring the repair of damaged tissue, thus restoring the balance between anti-inflammatory and pro-inflammatory cells.

INTRODUCCIÓN

El Sistema Inmune de los vertebrados está conformado por distintos órganos y tipos de células, que le permiten distinguir lo propio de lo no -propio y eliminar lo extraño (1) defendiéndolo de un amplio espectro de microorganismos patógenos, que en términos de prevalencia van de lo común a lo infrecuente. De esta manera, la invasión de microorganismos ambientales comunes, es prevenida por la defensa inmune innata en las mucosas y tejido epitelial y los patógenos altamente virulentos (generalmente menos prevalentes) involucran mecanismos de barrera inmune de la defensa innata para combatir al patógeno, como los son neutrófilos, monocitos sanguíneos, macrófagos y células dendríticas (DCs) (2).

Las células del sistema inmune derivan de progenitores pluripotenciales de la médula ósea, órgano donde ocurre la hematopoyesis, proceso por el cual se forman, diferencian y maduran las células sanguíneas (1,2). Estas células hematopoyéticas se dividen en tres compartimentos morfo-funcionales: células madres o "stem cells"; compartimento mitótico y compartimento de maduración y almacenamiento (1) .

La "stem cell" o célula madre pluripotencial, también denominada como unidad formadora de colonias mieloides y linfoides (CFU-ML), da origen a dos líneas celulares: mieloide y linfoide. En la línea mieloide granulocítica, eritroide, monocítica y megacariocítica(CFU-GEMM), se generan además CFU-MegE que dan origen a megacariocitos y eritrocitos y las CFU-GM que dan origen a las series granulocítica (CFU-G) y monocítica (CFU-M) (Figura 1) (1) .

La diferenciación y maduración de las células así originadas, depende de varios factores de maduración y citoquinas tales como el factor estimulador de colonias GM-CSF y las Interleuquinas (IL-) 3, 4, 6, 11, 12, entre otras (1).

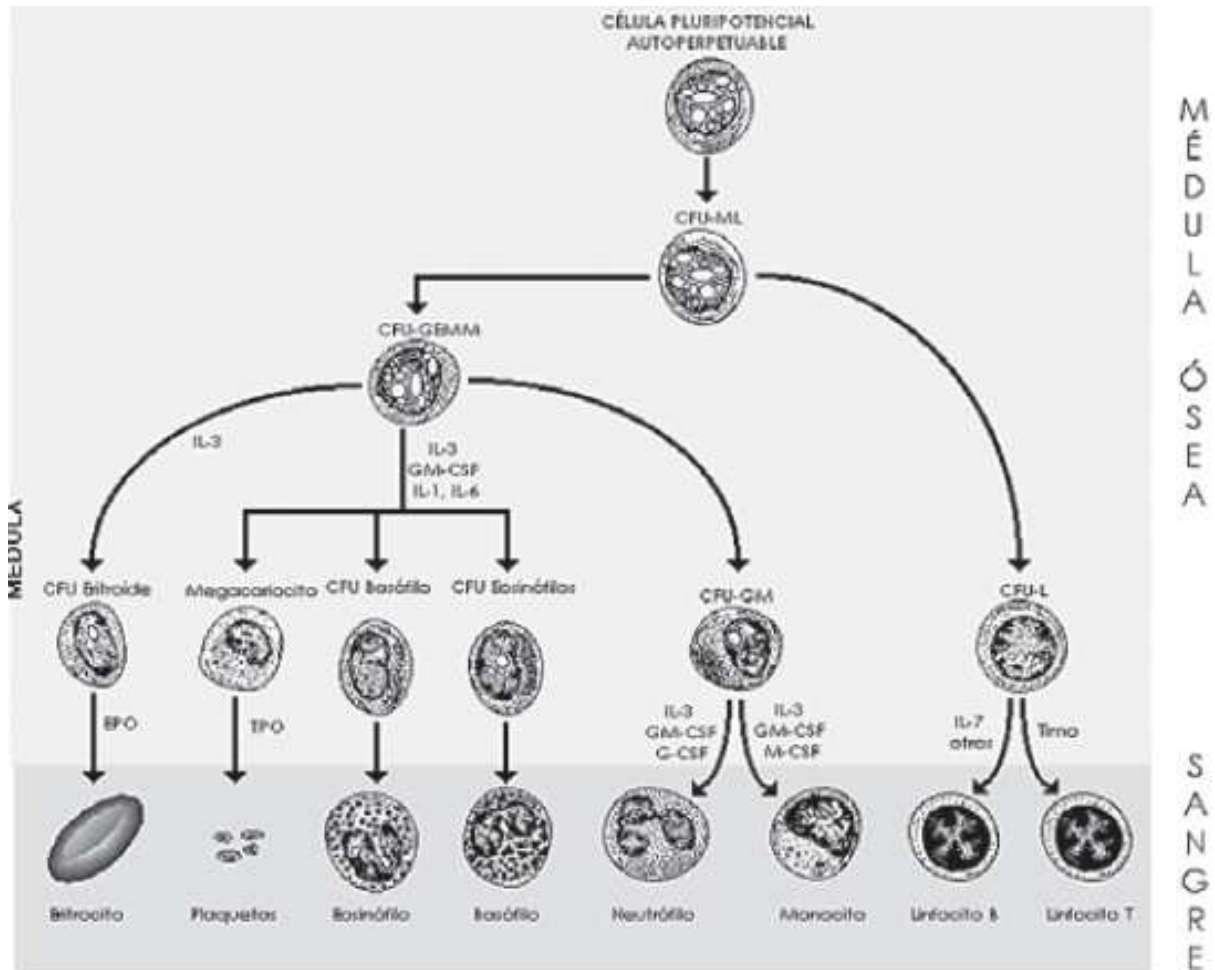


Figura 1.- Esquema de la hematopoyesis (Tomado de referencia (1))

SISTEMA FAGOCÍTICO-MONONUCLEAR

Pertenecen a este grupo, por su origen común, los monocitos, macrófagos y células dendríticas, cuyas funciones son: la remoción de células muertas, senescentes, extrañas y alteradas; regulación de la función de otras células; procesamiento y presentación de antígenos; participación en reacciones inflamatorias; destrucción de microorganismos y destrucción de células neoplásicas (1).

MONOCITOS

Los monocitos son un subconjunto de las células blancas circulantes que se originan en la médula ósea y subsecuentemente son liberados a la circulación periférica como células no divisibles. Representan la más versátil y dinámica población celular del sistema fagocítico mononuclear generando un nexo entre el sitio de hematopoyesis en la médula ósea y los órganos periféricos (3), mediando la defensa antimicrobiana del huésped (4).

En sangre, tienen una vida media de 3 días en el humano y de 1 día en el ratón (3) y pueden permanecer en el compartimento circulante o marginal para posteriormente pasar a los tejidos y transformarse en macrófagos (1).

Su función radica en la habilidad de movilizarse y acceder hasta el sitio de injuria para restablecer las poblaciones de macrófagos y células dendríticas de los tejidos, participar en reacciones inflamatorias locales y en la vigilancia inmune-innata del organismo (3,4,5).

Los monocitos se subdividen en distintas clases de acuerdo a su tamaño, a la expresión de receptores de quimioquinas, a la presencia de moléculas de superficie,

expresión de receptores de inmunidad innata, y a su habilidad de diferenciarse bajo estímulos de citoquinas o moléculas derivadas de agentes patogénicos (4)

Durante la infección, los monocitos y las células derivadas de monocitos entran a los linfonodos y promueven la respuesta inmune adaptativa. Algunos de ellos son reclutados al sitio de infección e inician la respuesta inflamatoria liberando mediadores humorales tales como factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y quimoquinas (2,4).

MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS

Los macrófagos son una de las poblaciones más pleiotrópicas del sistema inmune presentes en todos los tejidos (Figura 2). Son los efectores de la respuesta inmune innata y están involucrados en el inicio y regulación de la respuesta inmune adaptativa (6,7).

Los macrófagos han sido históricamente considerados células derivadas de los monocitos sanguíneos. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que bajo condiciones normales existe una población residente en los tejidos como: células de Kupffer en hígado, macrófagos alveolares en pulmón, macrófagos peritoneales y macrófagos pleurales, también se encuentran en la serosa del bazo, nódulos linfoides, microglia del cerebro, aparato reproductivo e intestino (1,3). Cada uno de estos fenotipos es determinado por el microambiente tisular, la matriz extracelular, los productos de secreción y moléculas de superficie de las células vecinas (6)

Los macrófagos tisulares tienen varias funciones en la mantención de los tejidos: homeostasis, eliminación de células senescentes, remodelación tisular, reparación, génesis y resolución de procesos inflamatorios (3).

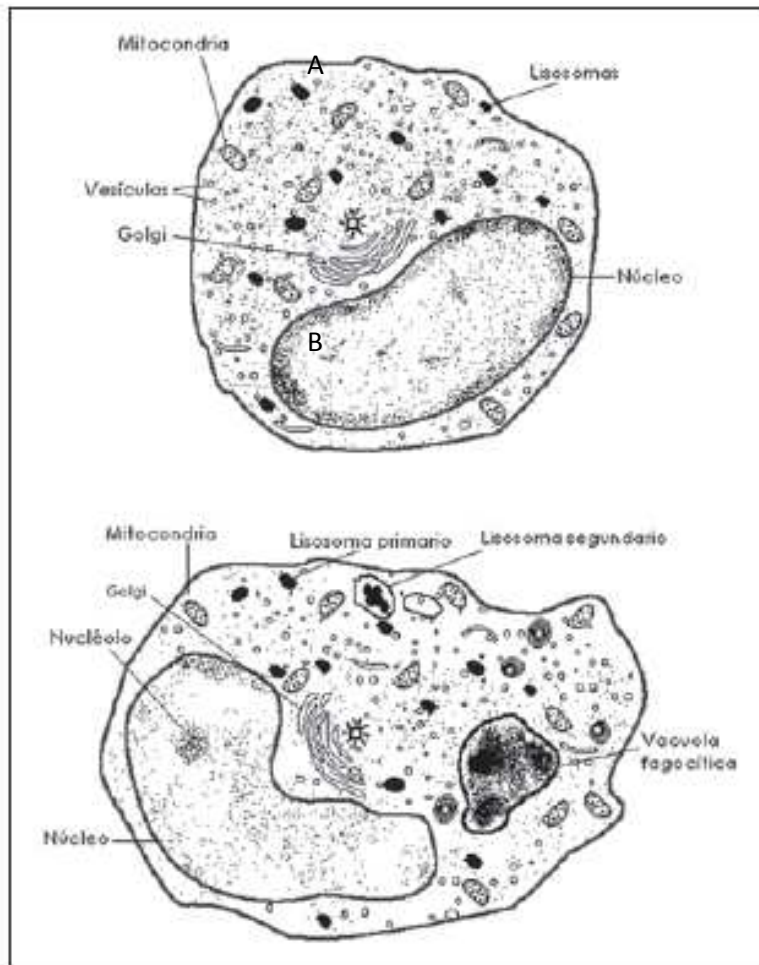


Figura 2.- Esquema de monocito (A) y de macrófago (B). (Tomado de referencia (1))

Los daños inflamatorios tisulares activan un rápido reclutamiento de precursores sanguíneos a los tejidos. La etapa final de la diferenciación monocito-macrófago está dada por las condiciones del tejido. De esta manera citoquinas, quimocinas, metabolitos tisulares y mediadores inflamatorios influyen en su diferenciación y, por lo tanto, el mismo monocito puede diferenciarse en distintos

tipos de macrófagos dependiendo del ambiente tisular y de los patógenos que se encuentren en dicho ambiente (5,8)

FENOTIPOS FUNCIONALES DE LOS MACRÓFAGOS

En respuesta a citoquinas, productos microbianos, tipo de tejido y el microambiente en el que se encuentren, los fagocitos mononucleares expresan propiedades morfológicas y funcionales especializadas y polarizadas (9). Esta plasticidad permite que los macrófagos se polaricen en macrófagos que destruyen patógenos bacterianos y son denominados tipo M1 o "clásicos" y en macrófagos que promueven la proliferación, tales como la reparación de tejidos, y son denominados M2 o "alternativos" (7).

FENOTIPO M1 ó CLÁSICO

La exposición a IFN-gamma, LPS bacterianos y la activación de algunos receptores de patrones moleculares asociados a patógenos tales como "toll like receptors" (TLR)-2 y 4, polarizan a los macrófagos hacia el fenotipo M1 (7). Estos se caracterizan por cambios en la membrana plasmática que incluyen un aumento en el contenido de colesterol, aumento de fosfatasa alcalina-1, aumento de fagolisosomas y vesículas endocíticas y disminución de la ecto 5'-nucleotidasa (6). Producen además, un cambio metabólico del macrófago hacia la vía glicolítica anaeróbica, incrementando la expresión de 6-fosfofructoquinasa-2 (PFK2) que mantiene altas concentraciones de fructosa-2,6-bifosfato y con ello gran cantidad de energía disponible, que permite una alta actividad microbicida frente al microambiente tisular hipóxico (10)

En respuesta a estos estímulos los macrófagos M1 secretan altas cantidades de proteínas neutras, como el activador del plasminógeno, elastasa, y colagenasa, presentan incremento de la actividad de hidrolasas ácidas, expresan citoquinas pro-inflamatorias, inducen a la enzima oxido nítrico sintasa (iNOS ó NOS2) para la producción de oxido nítrico (NO) a partir de Arginina, intermediarios de especies reactivas de nitrógeno (RNI), especies reactivas de oxígeno (ROS), liberan altos niveles de factor de necrosis tumoral α (TNF- α), prostaglandina (PG)-E2 y quimioquinas (IL-1 α ,IL-1 β , IL-6), promueven la respuesta Th1, generando una fuerte actividad microbicida y tumoricida (6,10,11).

La forma en que estos estímulos ambientales promueven al macrófago hacia el fenotipo M1, es a través de la activación de distintas vías de señalización (Figura 3). De esta forma, INF-gamma y TLR-4, promueven a los macrófagos hacia el fenotipo M1, mediante la activación de las vías de señalización IRF5/STAT1, donde IRF5 es esencial para la inducción de las citoquinas IL-12, IL-23 y para TNF- α . Se ha demostrado también que el factor inducido por hipoxia, HIF-1 α , induce la expresión de iNOS en este fenotipo de macrófagos (11)

FENOTIPO M2 ó ALTERNATIVO

En contraste a lo anterior, IL-4, IL-10 e IL-13 polarizan a los macrófagos hacia M2, estimulando la expresión de arginasa 1 (Arg1) que permite la metabolización de arginina hacia ornitina, precursor de poliamidas y colágeno que promueven la reparación y crecimiento tisular (7,11), la eliminación de parásitos, la progresión tumoral, cumplen función inmunorreguladora (10) al inhibir la producción de IFN-gamma, aumentar la producción de IL-10 y la expresión de receptores antagonistas

a IL-1 (RA-IL1) (6). La respuesta M2 también está asociada con la producción de tumor growth factor (TGF)- β y con factores de crecimiento como vascular endothelial growth factor (VEGF) o factor de crecimiento epidérmico (EGF) (7)

Los M2 utilizan como vía metabólica, la oxidación de ácidos grasos que permite dar energía en forma sostenida para la remodelación y reparación de los tejidos (10)

Las vías de señalización que promueven al macrófago hacia M2 incluyen a: IL-4 e IL-13, a través de los receptores IL-4R tipo I y II que activan la vía STAT6, permitiendo la transcripción de genes para receptor de manosa (Mrc1) y galactosa, factor quimiotáctico de eosinófilos (Ym1), cysteine-rich secreted protein FIZZ1(11,12) e IL-10 (13, 14) Por otra parte, IL-4 al unirse al IL-4R tipo I activa una vía alternativa para la polarización hacia el fenotipo M2, mediada por la activación de p38 MAPK y ERK (15, 16). STAT6 actúa además, secuestrando moléculas coactivadoras de STAT1 y factor nuclear kappa B (NF- κ B), suprimiendo la activación de genes inducidos por LPS e INF-gamma (6). IL-10 también promueve hacia el fenotipo M2-like, y mediante la activación de STAT3, el que media la expresión de genes de IL-10, *Mrc1* y *Tgfb1* (12). Además el factor inducido por hipoxia HIF-2 α induce la expresión de Arg1 (Figura 3) (11).

Se sabe que existen subtipos de M2 y que la expresión génica puede ser muy diferente; sin embargo, los efectos supresores comunes pueden ser explicados para todos estos subtipos, al menos en parte, por la regulación negativa de las acciones del NF- κ B y STAT1 (6)

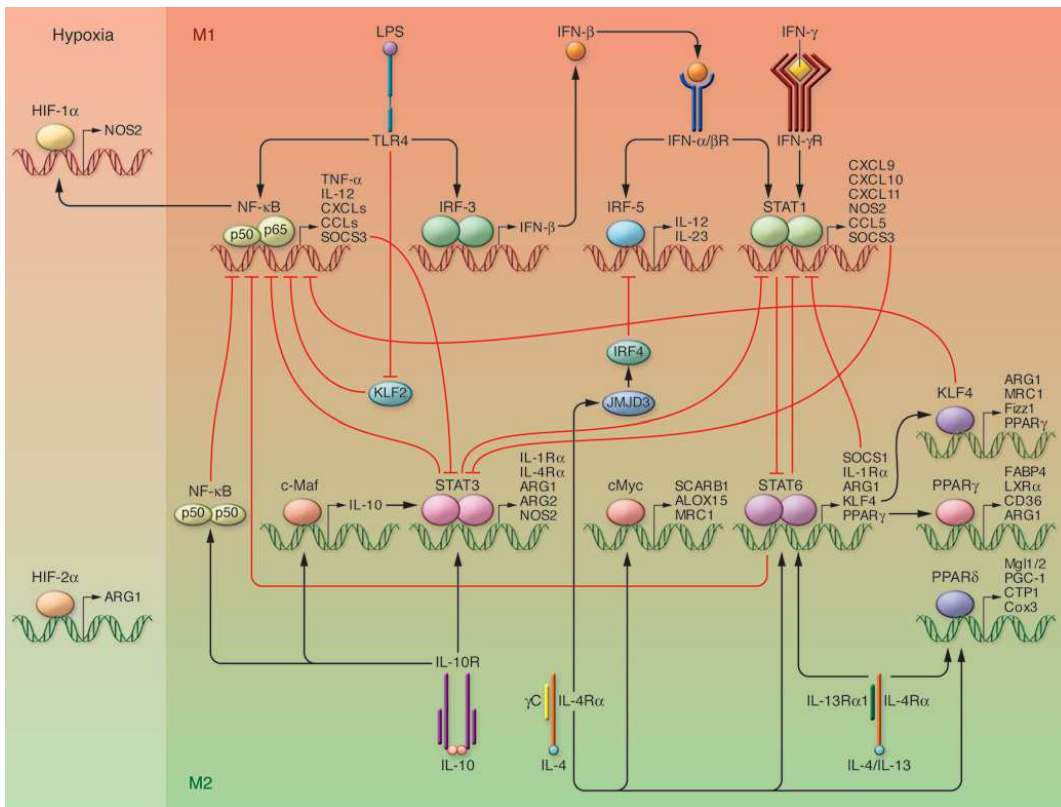


Figura 3.- Mecanismo de polarización de los macrófagos (Tomado de referencia (11))

Subtipos M2

Dentro de los macrófagos M2, se han descrito 4 subtipos que son activados por distintos estímulos y que presentan distintas propiedades (Figura 4):

- M2a o macrófago activado alternativo (17), cuya activación es inducida por IL-4 e IL-13. Tienen propiedades anti-inflamatorias, que inhiben la producción de INF-gamma, regulan la inflamación, realizan la remoción de "debris" y permiten la regeneración de tejidos. Tiene además una fuerte regulación sobre componentes de IL-1, contrarrestando las propiedades pro-inflamatorias de ésta (6).
- M2b o M2 propiamente tal (17): cuya activación está inducida por complejos inmunes y LPS bacterianos. Tienen alta expresión de IL-10, TNF- α , IL-1 β e IL-6 (6)

- M2c o macrófago desactivado (17): es activado por IL-10, glucocorticoides y TGF- β , inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias, inhibe la liberación de NO y ROS, inhibe la actividad antimicrobiana, antagonizan la producción de IL-6, IL-1 β , TNF- α (6). In vitro, se ha observado que este subtipo resulta de la desactivación de la transcripción de genes M1 dando origen a este fenotipo particular de M2 (17)
- M2d: es activado por IL-6 y adenosina. Produce IL-10, IL-12 TGF- β y también VEGF-A y TNF- α (17)

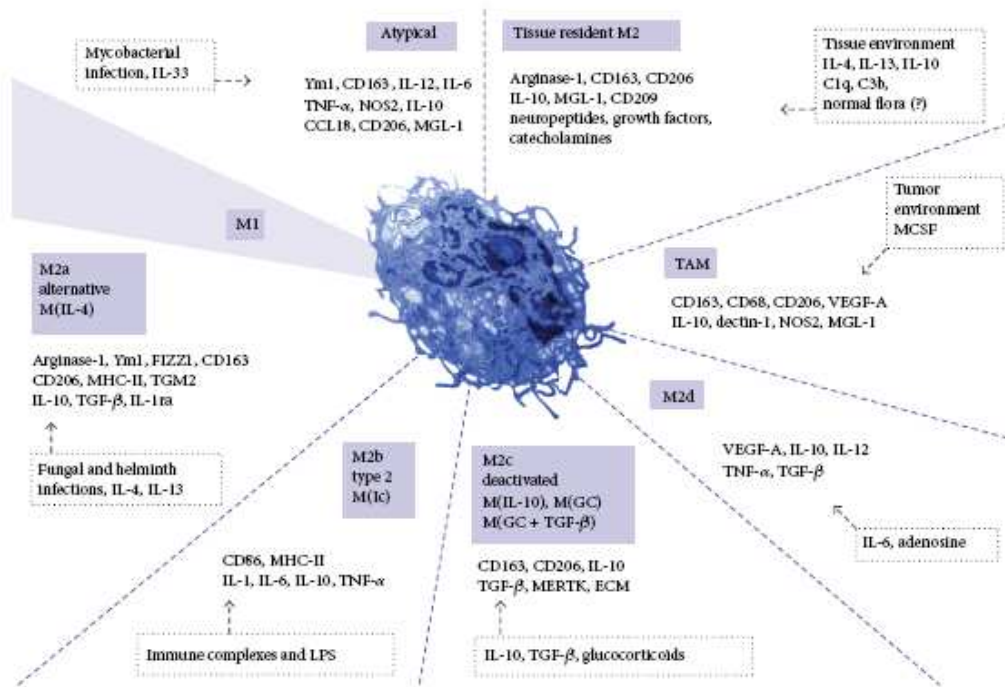


Figura 4.- Diagrama de los estados de activación de M2 (Tomado de referencia (17))

Vías de transducción

El reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por medio de receptores de reconocimiento de PAMPs (PRR) tales como los TLRs, activa una serie de vías de señalización intracelular que convergen en la activación de la respuesta inflamatoria. Esto se inicia con el reconocimiento de patógenos por TLR lo que inicia, a su vez, un proceso pro-inflamatorio que incluye la activación de monocitos y macrófagos tisulares, los cuales producen y liberan citoquinas inflamatorias tales como TNF- α . Esta citoquina, juega un papel principal en la amplificación de la respuesta inflamatoria por medio de la activación de las células inmunes y las estimula a liberar otras citoquinas pro-inflamatorias. Este proceso pro-inflamatorio conlleva la activación de una respuesta anti-inflamatoria, donde la citoquina IL-10 tiene un rol clave. La estrecha regulación entre la producción de TNF- α junto con el aumento en la producción de IL-10, son esenciales para la prevención del excesivo daño al huésped y la recuperación de la homeostasis inflamatoria (18,19).

El adenosín monofosfato cíclico (cAMP) ha sido ampliamente reconocido como un segundo mensajero en el control de la proliferación celular. Sus niveles intracelulares son regulados por la adenilato ciclasa (AC), enzima que lo sintetiza, y por la fosfodiesterasa, enzima nucleotido cíclica que lo degrada (20). El cAMP es considerado como un potente activador de la vía de la proteína kinasa A (PKA) la que media la fosforilación de la proteína cAMP responde element- binding protein (CREB), factor de transcripción que se une al sitio cAMP responde element (CRE), presente en la región promotora de TNF- α e IL-10 (19,20). La vía del cAMP es un regulador positivo de la transcripción de IL-10, a su vez que esta misma vía tiene un

efecto negativo sobre la producción de TNF- α . Los mecanismos involucrados en ello incluyen a que CREB activa a c-Jun que ocupa el sitio TNF- α -CRE suprimiendo la transcripción de TNF- α (19). La expresión de TNF- α inducida por LPS depende primariamente del factor de transcripción NF- κ B (18)

La activación de la vía del NF- κ B, factor de transcripción que en estado inactivo está secuestrado en el citoplasma por el inhibidor-kappa B (I κ B) (21), requiere que luego de la interacción de TLR4 con LPS, sea activado por la kinasa del I κ B (IKK). De este modo, IKK fosforila a I κ B permitiendo su posterior ubiquitinación y degradación y, subsecuentemente, este factor de transcripción libre de su inhibidor trasloca al núcleo donde se une a elementos de respuesta para NF- κ B localizados en el promotor de genes sensibles a este factor de transcripción, activando la expresión de citoquinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 β y de NOS para la expresión de iNOS (21,22, 23).

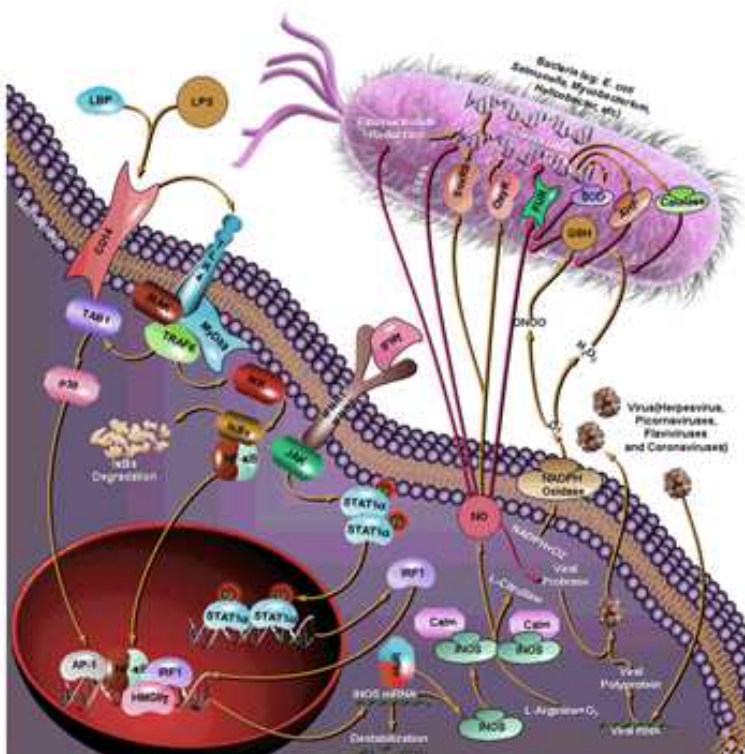


Figura 5.- Vías de señalización

PATOLOGÍAS EN EQUINOS

Las patologías inflamatorias/infecciosas en general, están frecuentemente asociadas con cambios dinámicos en la activación de macrófagos donde se pierde el equilibrio entre la activación de células M1 implicadas en el inicio de la inflamación, y las M2 asociadas con la resolución (11).

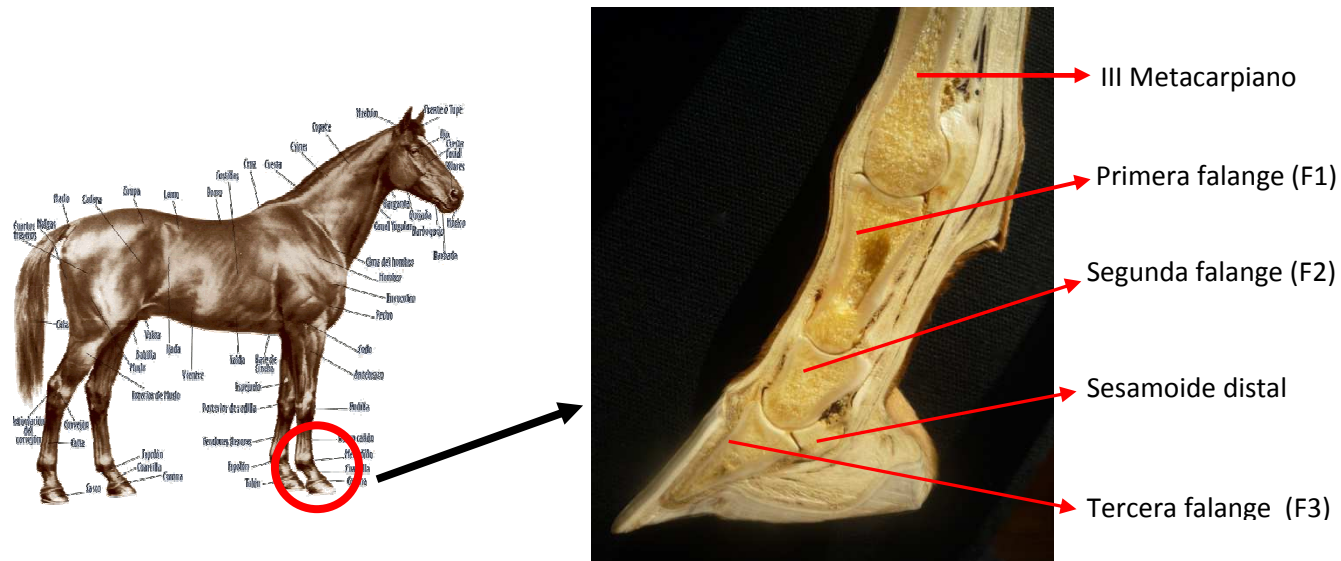
Una de las patologías que mejor clarifica estos eventos es la sepsis, la que está acompañada por una inflamación sistémica con excesiva producción de citoquinas pro-inflamatorias que incluyen el TNF- α e IL-1 β y donde las endotoxinas, componentes de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, son el factor patogénico mejor estudiados (23)

En los equinos existen dos grandes patologías asociadas con el aumento excesivo de citoquinas inflamatorias que pueden causar la muerte del ejemplar: estas son la Infosura o Laminitis y el Síndrome de Abdomen Agudo, pudiendo además este último desencadenar en un cuadro de Laminitis.

INFOSURA (LAMINITIS)

La Infosura o Laminitis en el caballo, corresponde a una enfermedad que constituye una urgencia clínica de carácter grave, donde un alto porcentaje de los ejemplares que la cursan deben ser sometidos a eutanasia como producto de alteraciones tróficas inducidas por la patología, que hacen imposible evitar la rotación de la tercera falange y posterior desprendimiento del casco (Figura 6) (26).

Figura 6.-



ETIOPATOGENIA

La Infosura o Laminitis, es por definición un proceso inflamatorio agudo aséptico que compromete los estratos dérmicos y epidérmicos del casco (26,27). Sin embargo, es fundamental entender esta enfermedad como una alteración multisistémica que involucra los aparatos digestivo, cardiovascular, hemático, renal, endocrino, músculo-esquelético, tegumentario e inmunológico, generando un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (26). Estas alteraciones dan lugar a la reducción de la perfusión capilar, isquemia y necrosis del corion, contribuyendo a la separación entre podófilo y queráfilo (Figura 7), acompañado de dolor y pérdida de la función de soporte y claudicación. Puede ocurrir por sobrecarga de ingesta de carbohidratos, en forma secundaria a un cuadro séptico (tales como el síndrome de abdomen agudo, endometritis aguda o pleuroneumonía) o por sobrecarga mecánica (27).

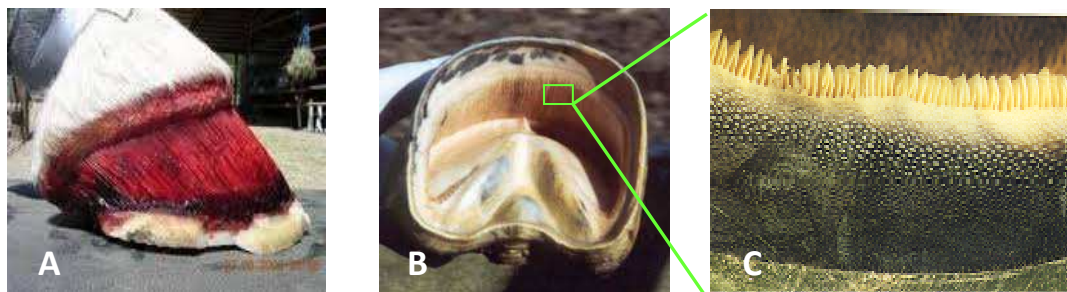


Figura 7.- Podofilo (A), Querafilo (B), Laminillas (C)

Laminitis por sobrecarga de ingesta de carbohidratos:

La flora intestinal normal en el equino se determina por el contenido de la dieta. De esta forma, la sobrecarga intestinal con carbohidratos altera el balance bacteriano intestinal aumentando la flora bacteriana productora de ácido láctico que se desarrolla a expensas de las demás poblaciones bacterianas. El ácido láctico, producto final del metabolismo de los carbohidratos, se produce en exceso llevando el pH intestinal - normalmente neutro- a uno de tipo ácido. La acidez intraluminal es perjudicial para las bacterias Gram negativas de la familia Enterobacteriaceae (*Lactobacillus* intestinales y *Streptococcus* homofermentativos como el *Streptococcus bovis*) provocando la muerte de éstas y la liberación de lipopolisacáridos (endotoxinas). Estas endotoxinas intraluminales actúan junto con el ácido láctico dañando la mucosa y permitiendo que ellas alcancen la circulación portal. Si los mecanismos hepáticos de depuración son insuficientes, se desarrollará endotoxemia y acidosis láctica (26,27)

Laminitis secundaria a cuadros sépticos:

La infosura es una secuela frecuente e indeseable de las infecciones bacterianas con respuesta sistémica. Estas pueden ocurrir en forma secundaria a pleuroneumonía y enfermedades gastrointestinales, entre estas últimas destaca la estrangulación-obstrucción intestinal cuadro que se caracteriza por la interrupción del flujo sanguíneo en el intestino afectado, con la subsiguiente isquemia, necrosis intestinal y endotoxemia (26,27).

Laminitis por sobrecarga mecánica:

Este tipo de laminitis se observa en un miembro anterior o posterior que actúa como soporte en un caballo que tiene una grave claudicación contralateral. Es probable que la falla laminar sea de naturaleza física como resultado de excesivas fuerzas de cizalla y esfuerzos contra la fase laminar y dermo-epidérmica, lo que crea una excesiva tensión sobre las láminas dérmicas fijadas a la tercera falange y desgarro físico del soporte laminar. También se ha sugerido que como resultado del apoyo excesivo se provoquen alteraciones del flujo laminar generando obstrucción o estasis del flujo sanguíneo (27)

Tanto el daño endotelial, dado por la alteración del flujo microvascular en las vénulas laminares, como el daño de las células del epitelio del tejido laminar liberan proteínas tales como el complejo S100A8/9 o Calprotectina (CP) (28) la que corresponde a una proteína perteneciente a la familia S100 de las Alarminas, moléculas endógenas que señalizan daño tisular o celular, y que son parte de las "damage-associated molecular patterns" (DAMPs) (29). El complejo S100A8/9, amplifica el daño inflamatorio de las láminas en el estado inicial de la laminitis por su

acción quimiotáctica para neutrófilos y macrófagos, siendo además un importante factor en la amplificación de los estados inflamatorios de estas células promoviendo el shock inducido por endotoxinas mediante su unión a TLR-4 activando la vía de señalización NFκB (28,29). Esto explicaría el desarrollo del cuadro sistémico observado bajo esta condición.

Las etiologías señaladas anteriormente son inducidos por la absorción sistémica y circulación de toxinas microbianas y endotoxinas, que conducen a procesos inflamatorios. Los procesos inflamatorios iniciales incluyen la activación sistémica de leucocitos y la activación del endotelio de la microvasculatura laminar. A su vez, estos conducen a una migración de los leucocitos desde los vasos hacia el tejido laminar con un aumento marcado de la actividad de COX-2 y de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β e IL-6 . El aumento de los estímulos inflamatorios se asocia con un aumento en la concentración o actividad de las metaloproteinasas de la matriz y daño oxidativo de los organelos celulares por especies reactivas de oxígeno (ROS) que generan disoxia celular. El conjunto de estos eventos sumado a la acción mecánica normal del tendón flexor digital profundo (TFDP) desencadenan la rotación de la tercera falange (F3) (Figura 8) (27) .

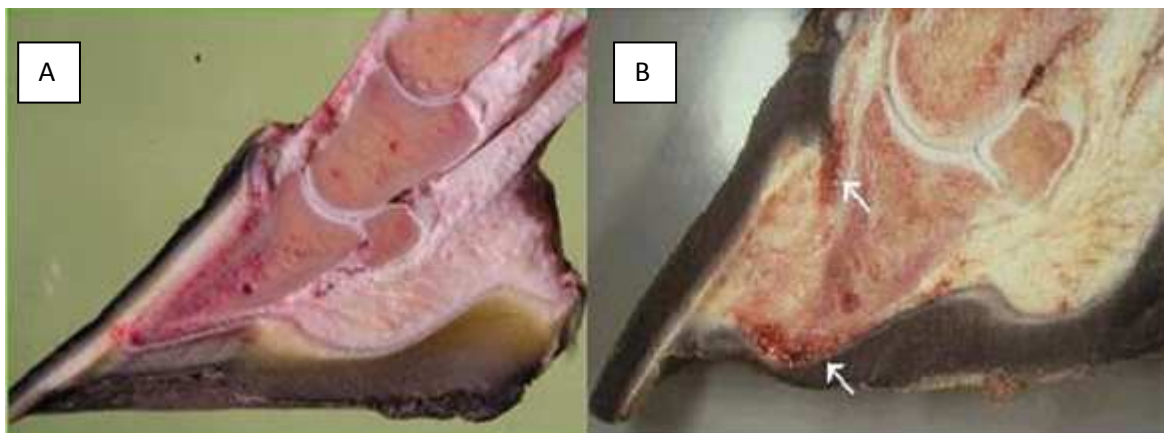


Figura 8.- Condición normal (A), Rotación de la tercera falange F3 (B)

TRATAMIENTO

El tratamiento de esta entidad clínica está orientado al control de la causa primaria, proveer analgesia, evitar la rotación de la tercera falange y al control de las alteraciones/ disfunciones de los sistemas hemodinámico, respiratorio, renal y metabólico (27).

Entre las terapias farmacológicas se ha postulado la utilización de pentoxifilina (PTX) por sus efectos vasculares, entre los que destaca el aumento de la deformabilidad de los eritrocitos, reducción de la viscosidad de la sangre, disminución de la agregación plaquetaria y disminución de la formación de trombos (26). La dosis recomendada por Robinson (26) es de 8.4mg/k p.o. cada 12 horas, sin embargo otro estudio indica que la administración oral de 10mg de PTX/Kg cada 12 horas por dos días, resulta en concentraciones séricas equivalentes a las observadas en dosis terapéuticas en humanos (30).

En modelos humanos, se ha descrito que PTX tiene efectos quimiotácticos sobre los leucocitos y un efecto inhibitorio sobre la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos (31). Los estudios de este fármaco realizados en equinos en procesos inflamatorios, se han orientado hacia sus efectos sobre la función de los neutrófilos tanto en su producción de superóxido donde se observa una disminución en la producción, como en los cambios de sus propiedades sobre el flujo microvascular observándose una disminución de su adherencia al endotelio y aumento del flujo sanguíneo. Los neutrófilos alteran el flujo sanguíneo microvascular mediante la oclusión de los pequeños vasos sanguíneos como resultado de la adherencia individual de neutrófilos al endotelio o por leucoaglutinación de neutrófilos (31, 32) sin que sea posible descartar que tales observaciones sean secundarias a efectos de PTX directamente sobre el endotelio vascular. A la fecha, son casi inexistentes las publicaciones en las que se señalen los efectos de este compuesto en relación a la inhibición o modulación de la respuesta inflamatoria en esta especie (26).

PENTOXIFILINA (PTX) COMO ESTRATEGIA TERAPEÚTICA

La PTX (Figura 9), ha sido considerada primariamente como una droga con propiedades hemorreológicas cuya utilización clínica se centra en el tratamiento de trastornos vasculares periféricos de naturaleza isquémica (33). La PTX, fármaco derivado de las metilxantinas (34), es un inhibidor no específico de la fosfodiesterasa, pero además se sabe que cuenta con propiedades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras que incluyen la inhibición del $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 , INF-gamma ,

supresión de la proliferación de células T, y disminución de la expresión de ICAM-1 por mecanismos aún no aclarados (34,35,36).

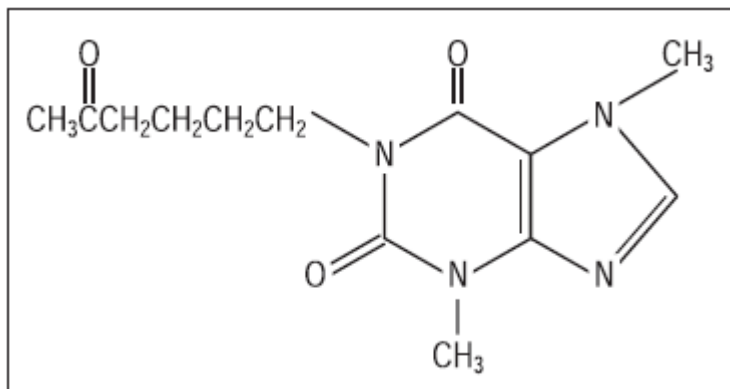


Figura 9.- Esquema de la Pentoxifilina

Por su parte, las fosfodiesterasas (PDEs), corresponden a una familia de isoenzimas involucradas en la regulación del equilibrio dinámico de los nucleótidos cíclicos (cAMP/cGMP), y han sido implicadas en la regulación de la vía de señalización I κ B/NF κ B y otros factores de transcripción. (37). Existen 11 isoformas diferentes de PDE (PDE 1-11). Algunas PDEs son selectivas para la hidrólisis de cAMP (PDE 4, 7 y 8) o cGMP (PDE 5,6 y 9) y otras pueden hidrolizar tanto cAMP y cGMP (PDE 1,2,3 y 11) (38). De estas isoformas la que se encuentra en mayor proporción en macrófagos y células inmunes corresponde a la PDE4(39,40,41). La inhibición específica de PDE4, promueve la acumulación de cAMP y la activación de la vía de señalización cAMP-PKA-CREB, suprimiendo la transcripción de TNF- α , IL-1 β e IL-6, y a su vez aumentando la expresión de IL-10 (41). Por otra parte, se ha descrito que la inhibición específica de isoformas selectivas para cGMP como PDE5 en células epiteliales alveolares (cuyo resultado es el aumento de cGMP intracitoplasmático), reduce la traslocación de NF κ B de modo similar a lo descrito con PTX (37).

La PTX, al inhibir la fosfodiesterasa, bloquea la degradación de cAMP aumentando indirectamente su concentración intracelular (20,42). En células Jurkat, PTX inhibe la expresión del mRNA de INF-gamma de manera dosis/dependiente y aumenta la expresión del mRNA de IL-10 (20,36). Lo anterior concuerda con lo observado por Loftis en células murinas RAW 264.7, donde se plantea que la PTX inhibe consistentemente la producción de TNF- α e iNOS de manera dosis/dependiente en macrófagos peritoneales, frente a estímulos de LPS e INF-gamma (20). En el modelo humano, PTX disminuye de manera dosis/dependiente la producción in vivo de TNF- α inducida por LPS en monocitos (36, 43). En equinos no existen estudios al respecto.

Por otra parte, estudios realizados en distintos tipos celulares de ratas han demostrado que tiene efectos opuestos sobre la producción de NO. Se ha postulado que esto no se debería a cambios en la actividad de iNOS, sino más bien a alteraciones en la expresión de mRNA de iNOS, a través del bloqueo de la activación de NF-kB, factor de transcripción que lo induce (35,36).

Con respecto a las características farmacocinética de la PTX, esta droga luego de su administración oral se absorbe en forma rápida y casi completa a nivel gastrointestinal. Su biodisponibilidad después de su administración endovenosa varía entre el 20 y 30%, con una amplia distribución tisular, un volumen de distribución (Vd) de 4,15 l/kg y una vida media de eliminación de alrededor de 2 horas. Con respecto a su metabolización, ésta se realiza principalmente en hígado y eritrocitos, identificándose 5 metabolitos (M1 a M5) dotados de actividad farmacológica similar al compuesto madre. En humanos su excreción se realiza en riñón donde más del 90% se recupera como metabolitos M4 y M5 (33).

En equinos en el estudio realizado por Crisman 1993 (44) se determinó que la biodisponibilidad relativa de la PTX administrada por vía oral es más alta (1a 10 horas) que cuando se administra por vía intravenosa ($1,09 \pm 0,67$ horas), con un volumen de distribución de $2,81 \pm 1,16$ l/kg y un alto aclaramiento plasmático ($3,06 \pm 1,05$ l/kg/hora) con metabolización hacia el metabolito 1 (44).

Aún cuando los antecedentes disponibles en la literatura en relación a los efectos de PTX sobre mediadores humorales como las citoquinas son escasos, es posible plantear que en equinos los efectos clínicos benéficos de PTX posiblemente son secundarios a la acción de este fármaco sobre células inflamatorias como los macrófagos modulando el perfil de polarización de éstos, lo cual a la fecha no ha sido estudiado. En esta investigación planteamos estudiar si efectivamente pentoxifilina tiene efecto en la actividad de macrófagos equinos ya sea por inhibición del fenotipo M1 o por su capacidad para modificar este fenotipo hacia el fenotipo anti-inflamatorio (M2)

HIPOTESIS

Pentoxifilina inhibe la actividad de macrófagos equinos del fenotipo M1 lo cual puede explicar su efecto regulador en procesos inflamatorios

OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la Pentoxifilina en la polarización de macrófagos equinos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

- 1.- Determinar en un modelo murino de macrófago, la curva de concentración/respuesta óptima de PTX para conseguir un efecto anti-inflamatorio.
- 2.- Determinar en un modelo murino de macrófago, la curva tiempo/respuesta, requerido por PTX para obtener el efecto anti-inflamatorio.
- 3.- Determinar en modelo equino, si PTX tiene un efecto inductor de fenotipo M1 o M2 de macrófagos.
- 4.- Determinar en modelo equino, si PTX inhibe la expresión del fenotipo de macrófagos M1 generados en respuesta a un inductor de macrófagos M1 conocido.
- 5.- Determinar en modelo equino, si PTX modifica el fenotipo de macrófagos M1 a macrófagos M2.

MATERIAL Y MÉTODO

Línea celular murina y Cultivos celulares

Células RAW 264.7 obtenidas del laboratorio de Inmunomodulación Neuroendocrina de la Universidad de Chile, fueron cultivadas en DMEM suplementadas con 10% FBS, 2mM de L-glutamina, 50 U/mL de penicilina G y 50 µg/mL de estreptomina a 37°C en una incubadora humidificada y suplementada con 5%CO₂. Cuando la confluencia alcanzaba a 70-80%, las células fueron tratadas con tripsina (0,05%), recogidas, contabilizadas en hemocitómetro ó cámara de Neubauer y sembradas en placas de 6 pocillos de 10cm² a una concentración de 1x10⁶ cel/mL bajo las mismas condiciones señaladas para el cultivo. Se dejaron reposar "over night" y a la mañana siguiente se procedió a realizar los experimentos diseñados.

Selección de ejemplares equinos

Los criterios de inclusión de los ejemplares para este estudio fueron los siguientes: equinos Fina Sangre de Carreras (F.S.C.), sin distinción de sexo, de entre 3 - 5 años de edad, adscritos al Club Hípico de Santiago S.A. y que no presentaban ni hubiesen presentado ningún tipo de patología sistémica en los 2 meses previos a la toma de muestra, no estuviesen cursando con alteraciones musculoesqueléticas agudas, no estuviesen siendo sometidos a tratamientos anti-inflamatorios sistémicos y que se encontrasen realizando su protocolo de entrenamiento en forma normal.

Fueron excluidos del estudio todos aquellos ejemplares que no reunían los requisitos mencionados anteriormente.

Muestra de sangre

De cada uno de los de los 4 ejemplares seleccionados, se recolectó 30 mL de sangre venosa en tubos con EDTA obtenida por venopunción de la vena yugular con técnica estéril y por personal entrenado (se adjunta aprobación de comité de ética CBA, Facultad de Medicina U. de Chile) para obtener de ellos la fracción de células correspondiente a los mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Cultivos celulares de macrófagos derivados de monocitos equinos

De la sangre recolectada se obtuvo los PBMC por método de Ficoll según protocolo. Estas células fueron contabilizadas en hemocitómetro ó cámara de Neubauer para luego ser sembradas a una concentración de 2×10^6 cél/mL en placas de 6 pocillos de 10cm^2 con medio RPMI-1640 suplementado con 10% FBS, 2mM de L-glutamina, 50 U/mL de penicilina G y 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, a 37°C en una incubadora humidificada con 5% CO_2 . Luego de 4h, y con el fin de conservar la fracción correspondiente a los monocitos, las células fueron observadas al microscopio de luz a fin de valorar el cambio morfológico resultante de la adhesión al plástico y con un lavado suave con PBS 1x, se eliminó las células no adheridas. Posteriormente, las células así seleccionadas fueron cultivadas en medio antes descrito, se las dejó reposar "over night" y al día siguiente, se procedió a realizar los procedimientos experimentales propuestos.

MÉTODO

Tratamiento con Pentoxifilina

Células RAW 264.7

- Para determinar la curva de concentración/efecto, las células fueron estimuladas con LPS (Lipopolysaccharides de *E. coli*, laboratorio Sigma-Aldrich Chemie®, Germany) (25ng/ml) por 18 horas y posteriormente expuestas a PTX (Pentoxifylline laboratorio Sigma-Aldrich Chemie®, Germany) previamente solubilizada según protocolo y preparada para trabajar a concentraciones de 0, 100 y 250 µg/mL. El tiempo de exposición a PTX fue obtenido de la literatura revisada y este tiempo fue de 1h (24).

- Para determinar la curva tiempo/efecto las células fueron estimuladas con LPS (25ng/ml) por 18 horas y posteriormente expuestas a PTX a una concentración de 250 µg/mL y los tiempos de exposición fueron: 15, 30, 60, 90 y 120min.

Células equinas

- Las células fueron estimuladas con LPS (25ng/ml) o hIL-4 (20ng/ml (45) por 18 horas y posteriormente fueron expuestas a PTX a una concentración de 250µg/mL por 90 minutos (datos obtenidos de los experimentos en células RAW).

Extracción de RNA y obtención de cDNA para células RAW y células equinas.

La extracción de RNA se realizó por el método de Trizol Reagent (Total RNA Isolation Reagent, Life Technologies). Las células fueron centrifugadas a 800rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y luego fueron re-suspendidas en PBS 1X. Posteriormente se volvieron a centrifugar a 7500rpm por 25 segundos a 4°C, se

eliminó nuevamente el sobrenadante y se agregó 250µl de PBS 1X, 750µl de Trizol y 200µl de cloroformo para continuar con una centrifugación a 12000rpm por 10min. Del resultado de este proceso se recogió la fase acuosa para luego agregarle 500µl de isopropanol y centrifugar nuevamente a 12000rpm por 15min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó etanol al 75%. Nuevamente la muestra fue centrifugada a 7500rpm por 5 min a 4°C, eliminando el sobrenadante para finalmente re-suspender en 10µl de agua RNase free (Invitrogen). La muestra se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

El mRNA así obtenido fue cuantificado por espectrofotometría. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con kit DNase (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar la posibilidad de contaminación con DNA genómico.

Transcripción Reversa

A cada muestra de RNA se le agregó 1µl de *random primers*, y luego el RNA fue tratado en termociclador por un ciclo consistente en 5 min a 70°C y 5 min a 4°C. Posteriormente se preparó un *mix* con buffer 5X, MgCl₂ 25mM, dNTP 10mM, RNasin, transcriptase reverse y agua RNase free. 15µl de este *mix* fueron agregados a cada muestra. Se realizó un spin y luego fue tratada por 5 min a 25°C, 60min a 42°C, 15 min a 70°C y 15min a 4°C. El resultante del proceso descrito se guardó a -20°C para su posterior análisis.

Los partidores fueron diseñados a partir de la base de datos genéticos de NCBI, en conjunto con el programa AmplifX 1.5®. Las secuencias seleccionadas se describen en la tabla 1.

Con el fin de asegurar las condiciones óptimas para el funcionamiento de la enzima limitante del proceso de transcripción reversa, se realizó un ensayo que busca probar la concentración óptima de magnesio. Para ello, se preparó un *mix* con buffer 5X, dNTP 10mM, Gotaq® 5u/μl y los *primers* específicos para TNF-α, IL-10 y β-actina tanto murino como equino (Integrated DNA Technologies®) (tabla 1) y se agregó el cDNA, mix y distintas concentraciones de MgCl₂ 25mM. Cada una de estas mezclas se llevó a un programa de PCR convencional consistente en: 5min a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C a por 15 segundos, 72°C por 15 segundos, terminando con 72°C por 10min y hold 4°C. Finalmente las muestras se corrieron en un gel de agarosa 2% y se escogió el magnesio que generó la banda de mejor calidad en este amplificado evaluada por método de transiluminación.

Tabla 1: Primers para RT PCR tiempo real

mRNA	Forward	Reverse
mTNF-α	5'CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CT -3'	5' - GCT ACG ACG TGG GCT ACA G-3'
mIL-10	5' - ATT TGA ATT CCC TGG GTG AGA AG-3'	5' - CAC AGG GGA GAA ATC GAT GAC A-3'
mACTβ	5' - CTG GCA CCA CAC CTT CTA CAA CGA G-3'	5'-GTA CAG GTC CTTACG GATGTC GAC G- 3'
Eq TNF-α	5' - CTT GTC CCT CAG CCT CTT CTC CTT C -3'	5'-TCT TGA TGC CAG AGA GGA GGT TGA C -3'
Eq IL-10	5' - TGC TAT GTT ACC TGG TCT TCC TGG -3'	5' - TAG TAG AGT CAC CGT CCT GGA TGC -3'
Eq ACTβ	5' - CTG GCA CCA CAC CTT CTA CAA CGA G -3'	5' - GTA CAG GTC CTT ACG GAT GTC GAC G -3'

qRT-PCR

Para analizar el mRNA de TNF- α e IL- 10 y el *housekeeping* (Beta actina) para cada situación experimental, al cDNA se le adicionó un mix consistente en: buffer 5X, MgCl₂ mM, dNTP 10mM, Gotaq® 5u/ μ l, primers, Syber 1/2000 y agua RNase free. Luego se realizó un PCR tiempo real con el siguiente programa: 25° por 30 segundos, 5 minutos a 95°C, luego 35 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 15 segundos, luego 95° por 15 segundos, 25° por 1 minuto, para terminar con 10 minutos a 72°C y hold a 4°C. La cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de cada muestra se realizó por el método de cuantificación absoluta de número de copias de cDNA obtenidas como resultado del programa de RT-PCR.

ANALISIS ESTADÍSTICO

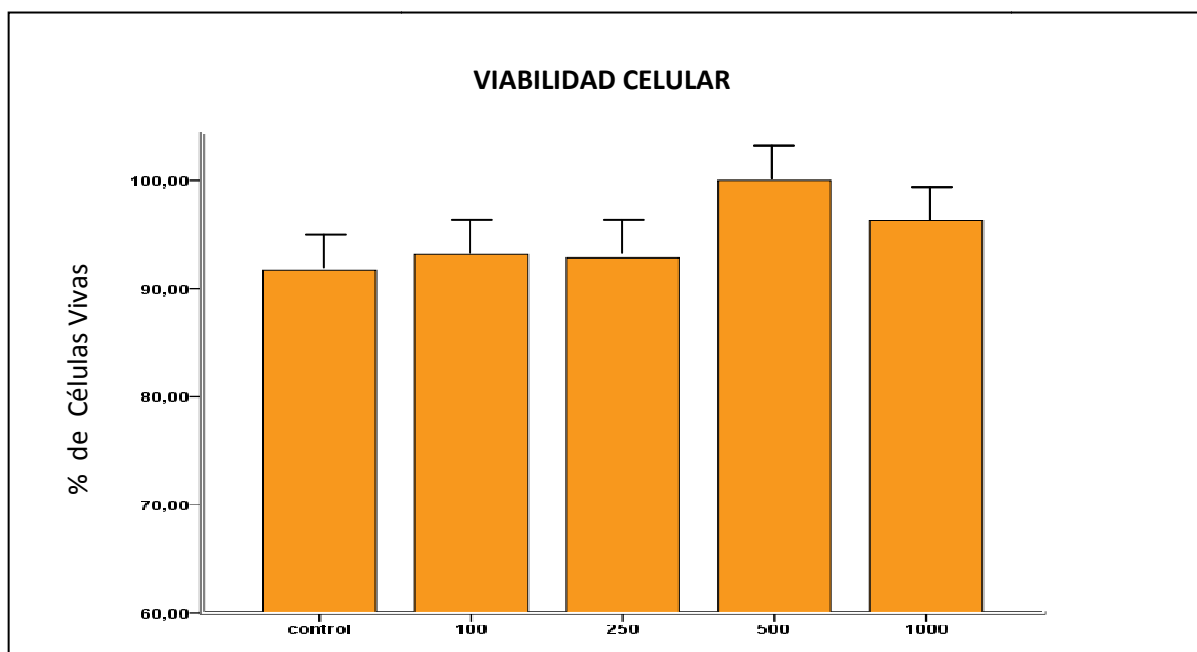
El análisis estadístico fue realizado mediante el modelo no paramétrico de Kruscall-Wallis para evaluar las diferencias entre múltiples grupos y complementado con la prueba de Scheffé para determinar diferencias significativas con un $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Ensayo de viabilidad celular

Para determinar si PTX tiene un efecto sobre la viabilidad de las células expuesta a él, células RAW 264.7 fueron tratados con PTX a concentraciones de 100, 250, 500 y 1000 μ g/mL por 1 hora. Para valorar la viabilidad celular se utilizó la técnica de exclusión de Trypan Blue. Como se observa en la figura 10, la viabilidad celular fue mayor al 90% independientemente de la concentración de PTX utilizada.

FIGURA 10.- Efecto de PTX sobre la viabilidad celular de células RAW 264.7

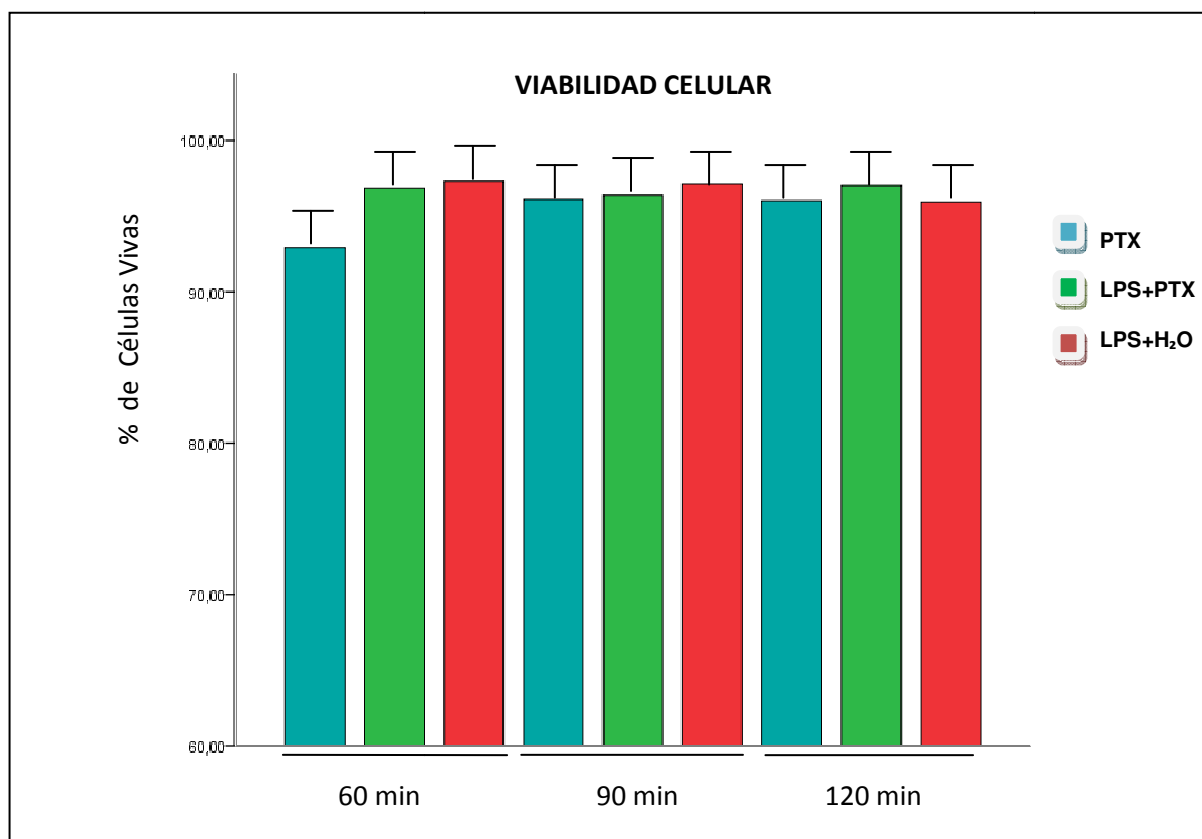


A continuación valoramos si PTX, a mayores tiempo de exposición, podría tener efecto en la viabilidad celular. Para ello, las células fueron cultivadas con PTX (250 μ g/ml) por diferentes tiempos: 60, 90 y 120 minutos. Como se observa en la

figura 11 la viabilidad celular fue mayor al 95% independiente del tiempo de exposición a PTX utilizado.

Finalmente, se realizó la evaluación de viabilidad celular frente a la exposición de LPS (25ng/ml) por 18 horas con y sin exposición posterior de PTX (250 μ g/ml) a los 60, 90 y 120 minutos. En la figura 11 se observa que la viabilidad celular fue mayor al 95% en la células cultivadas con LPS y expuestas o no a PTX.

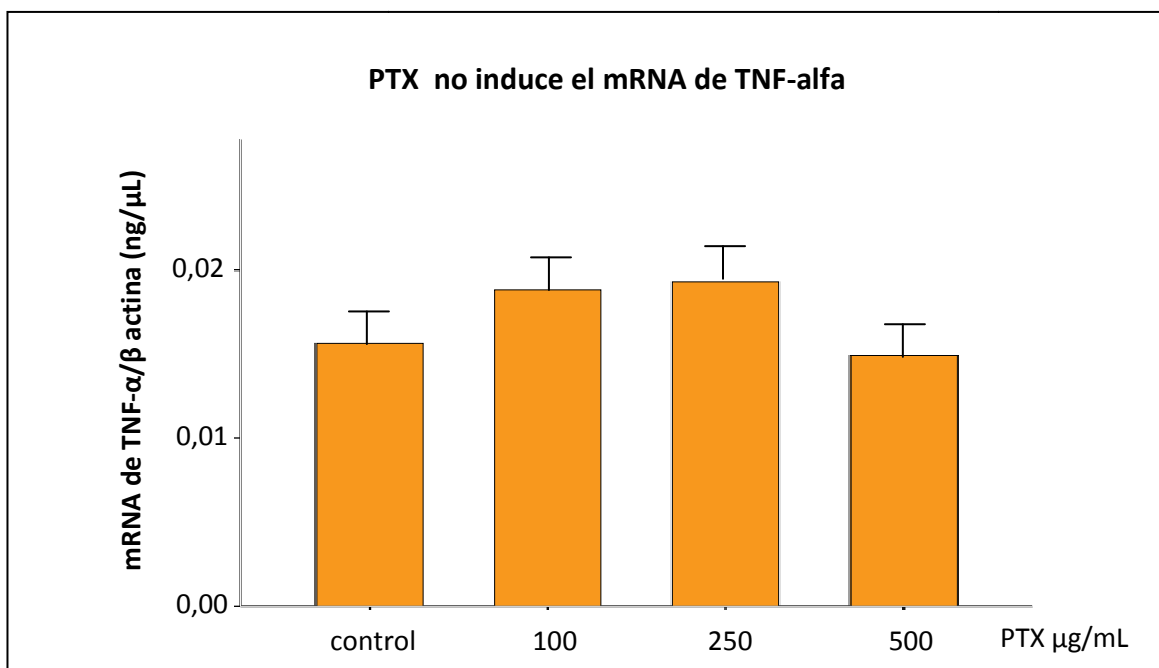
FIGURA 11.- Efecto de PTX y LPS a distintos tiempos de exposición sobre la viabilidad celular de células RAW 264.7



Efecto de PTX en células RAW 264.7

Primero, con el fin de evaluar si PTX por sí misma tenía la capacidad de inducir la expresión de mRNA de TNF- α en células RAW 264.7, las células fueron cultivadas en presencia de PTX a concentraciones de 0, 100, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 1 hora. Luego, se extrajo el RNA y cuantificamos el contenido de mRNA de TNF- α . La figura 12 muestra que PTX no induce la expresión de mRNA de TNF- α y que no existen diferencia estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones de PTX utilizadas.

FIGURA 12.- Efecto de PTX sobre la expresión de mRNA TNF- α en línea celular RAW 264.7

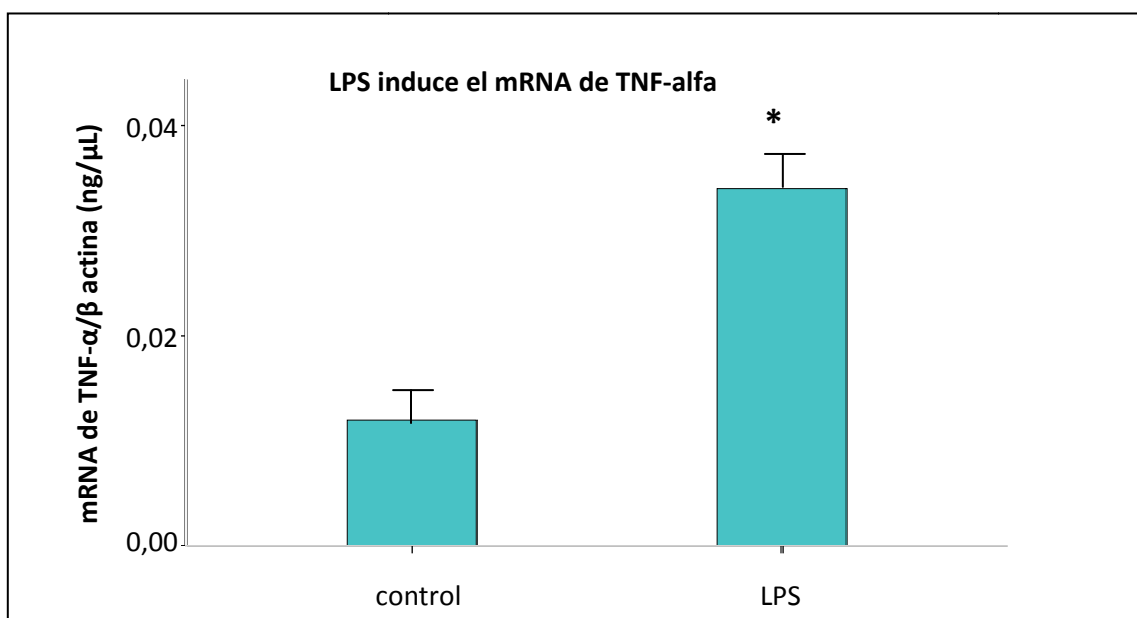


$p \leq 0,05$ (n=4).

Efecto de LPS en células RAW 264.7

Para determinar si efectivamente LPS induce la expresión de mRNA de TNF- α , células RAW 264.7 fueron cultivadas con LPS (25ng/mL) por 18h. Como se muestra en la figura 13, en presencia de LPS se observó un incremento significativo del contenido celular del mRNA de TNF- α ($p=0,028$) respecto del control.

FIGURA 13: Efecto de LPS sobre la expresión de mRNA TNF- α en línea celular RAW 264.7



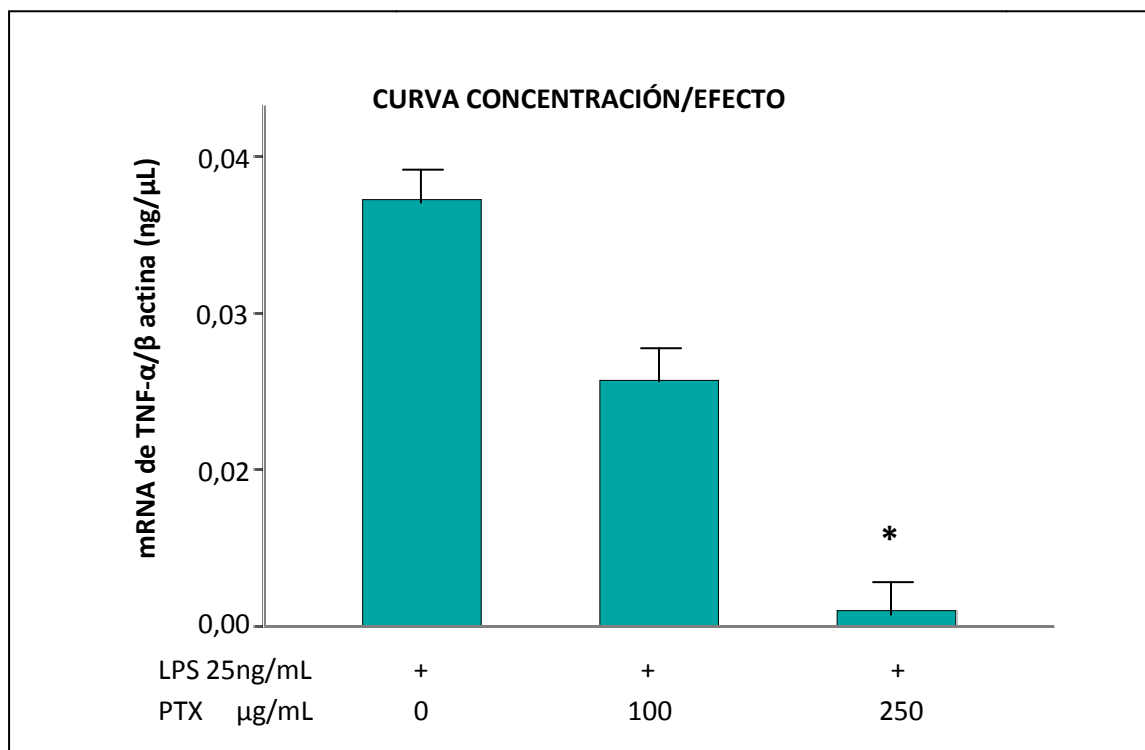
* $p \leq 0,05$ (n=4).

OE1: Determinación de la curva concentración/efecto de PTX en células RAW 264.7

Para dar cumplimiento al objetivo específico 1, las células RAW 264.7 fueron cultivadas por 18h con LPS y luego tratadas con distintas concentraciones de PTX (0, 100, 250 μ g/mL) por 60min. Como se muestra en la figura 14 se observó una

disminución significativa del contenido del mRNA de TNF- α a una concentración de 250 μ g/ml de PTX ($p=0,018$)

Figura 14 : Efecto de distintas concentraciones de PTX en células RAW 264.7



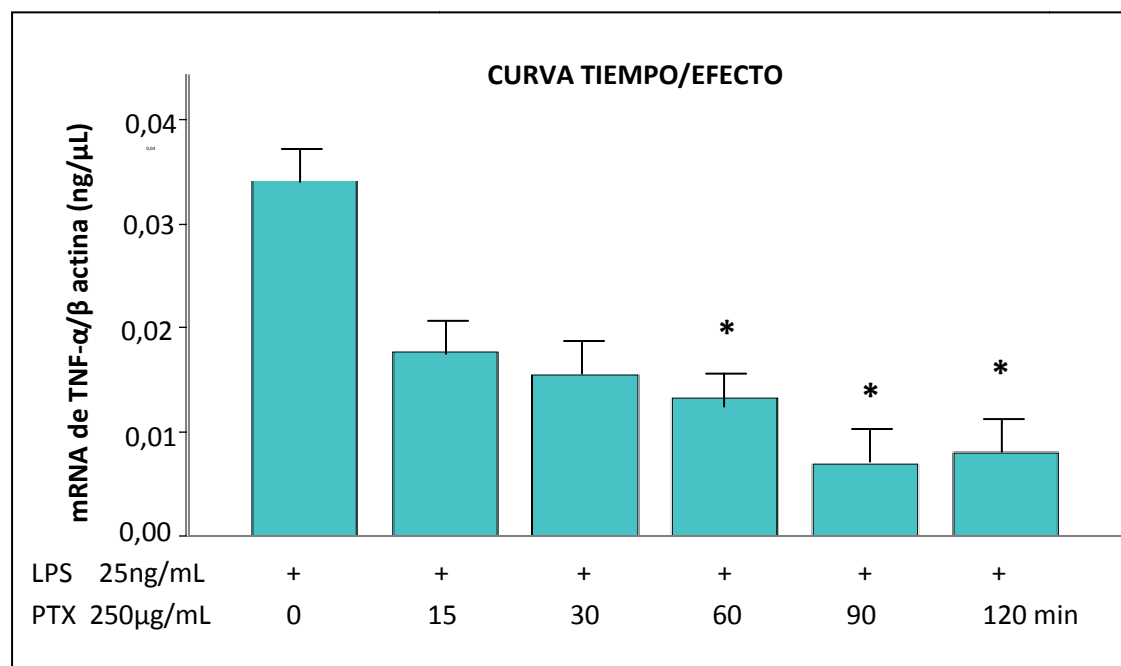
* $p \leq 0,05$ (n=4).

OE2: Determinación de la curva tiempo /efecto de PTX en células RAW 264.7

Para dar cumplimiento con el objetivo específico 2 y con la finalidad de evaluar si tiempos de exposición diferentes a los utilizados en el ensayo previo podrían modificar el resultado observado, células RAW 264.7 cultivadas por 18h con LPS, fueron expuestas a 250 μ g/ml de PTX por 60min y por tiempos inferiores (15 y 30min) y superiores (90 y 120min) a éste. Como se muestra en la figura 15, se observó disminución del contenido celular del mRNA de TNF- α para 60min - igual que

en el ensayo previo-. Tiempos menores a él (15 y 30min) no tuvieron efecto mientras que a tiempos superiores a 60min (90 y 120min) se observó disminución del contenido celular del mRNA de TNF- α respecto del control ($p=0,0018$). Luego, quisimos evaluar si había diferencia en la magnitud de la disminución del contenido del mRNA de TNF- α observado a 60, 90 y 120min de exposición a PTX, pero el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ellos.

FIGURA 15.- Efecto de distintos tiempos de exposición a PTX en células RAW 264.7

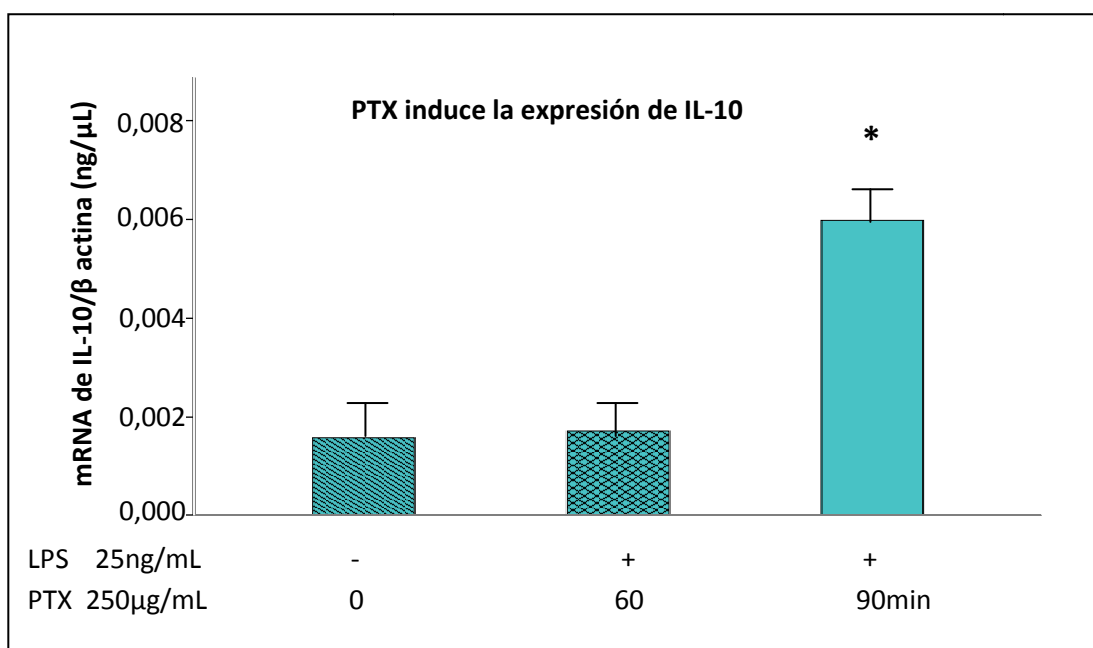


* respecto del control: $p \leq 0,05$ ($n=4$).

Del resultado anterior en el que TNF- α marcador de activación M1 disminuye, nos motivó a evaluar si ésto podría asociarse con activación M2. Para ello, evaluamos si PTX podría modificar el contenido celular del mRNA de IL-10, citoquina clásica marcadora de la activación del fenotipo M2 de macrófagos. Utilizando el

mismo modelo experimental antes señalado, analizamos el contenido celular del mRNA de IL-10 en células RAW 264.7 tratadas con LPS por 18h y luego con PTX 250µg/ml por 60 y 90min. Como se muestra en la figura 16, se observó un incremento significativo del contenido celular del mRNA de IL-10 a los 90min de cultivo ($p=0,029$) mientras que el análisis a 60min de exposición a PTX no fue diferente que el control.

FIGURA16.- Efecto de PTX sobre la expresión de mRNA de IL-10 en células RAW 264.7



* respecto del control: $p \leq 0,05$ (n=4).

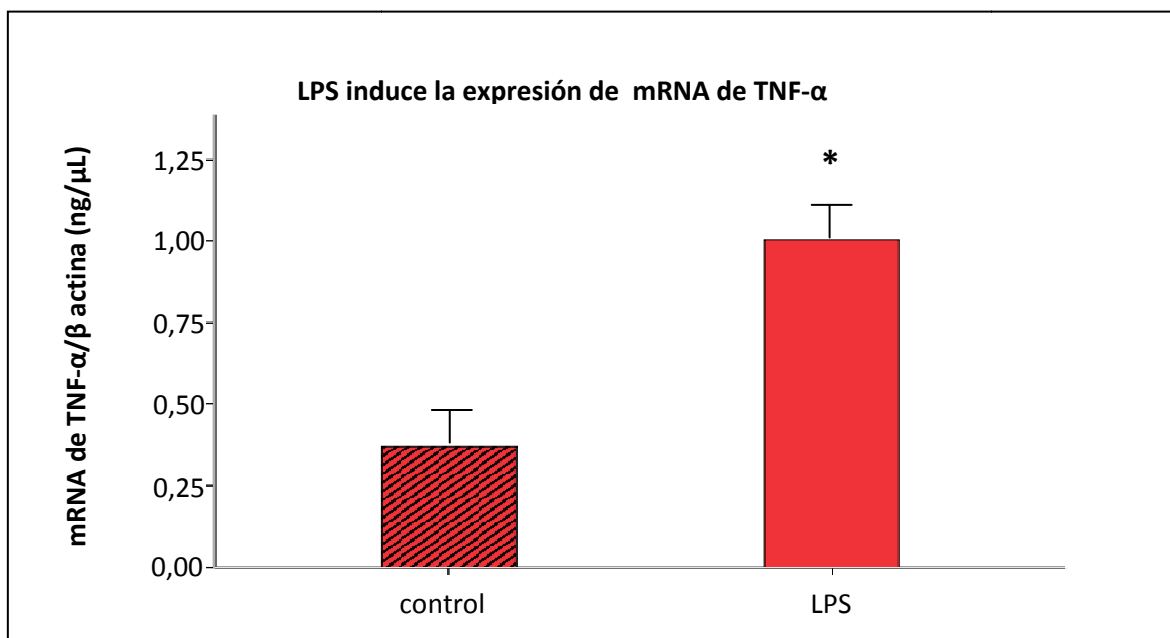
Con los resultados obtenidos, podemos decir entonces, que en células RAW 264.7 cultivadas con LPS y luego tratadas con PTX 250µg/ml, respecto del control, a los 90min de exposición se observa una disminución del contenido de mRNA de

TNF- α y un incremento del mRNA de IL-10, y que el efecto sobre TNF- α ya se observaba a los 60min de tratamiento.

Efecto de PTX en Células equinas

Primero, evaluamos si las células equinas efectivamente respondían a LPS. Para ello las células equinas, fueron cultivadas en presencia de LPS (25ng/mL) por 18h y posteriormente se analizó el contenido celular del mRNA de TNF- α . Como se muestra en la figura 18, efectivamente estas células respondieron a LPS con incremento del contenido celular del mRNA de TNF- α ($p=0,032$).

FIGURA 17.- Efecto de LPS sobre la expresión de mRNA de TNF- α en células equinas derivadas de PBMC

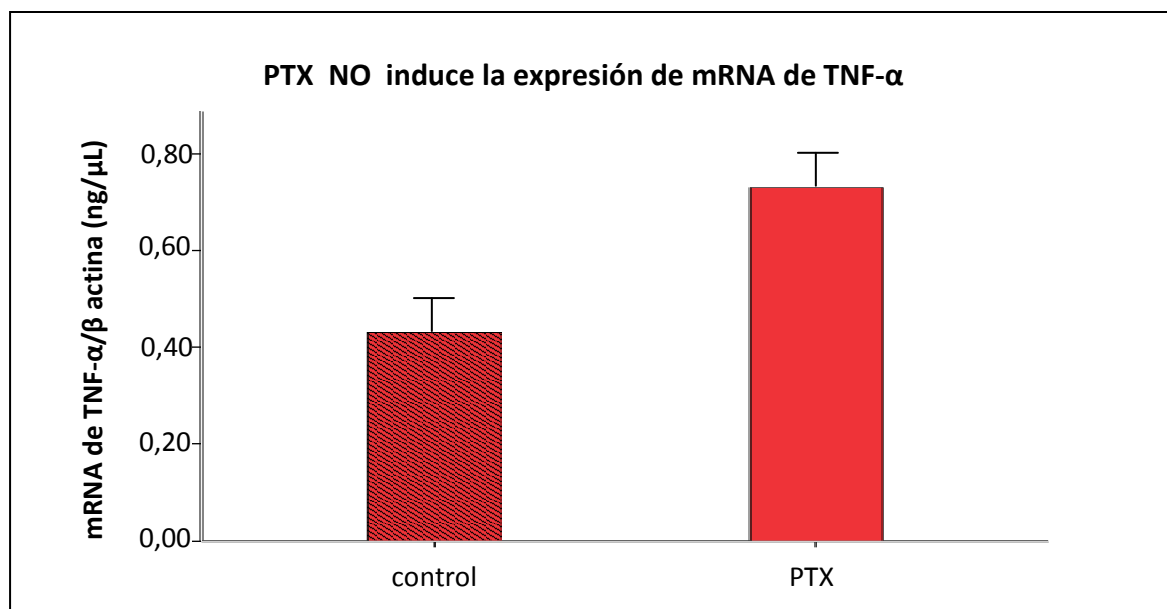


* $p \leq 0,05$ (n=4).

OE3: Determinar, si PTX tiene un efecto inductor de fenotipo M1 o M2 de macrófagos equinos.

Para determinar si PTX es inductor de fenotipo M1 de macrófagos equinos, estas células fueron tratadas con PTX 250µg/ml por 90min, seguido de la cuantificación del contenido celular del mRNA de TNF-α. Como se muestra en la figura 18, no se observó un aumento estadísticamente significativo del contenido del mRNA de TNF-α en presencia de PTX.

FIGURA 18.- Efecto de PTX sobre la expresión de mRNA de TNF-α en células equinas derivadas de PBMC

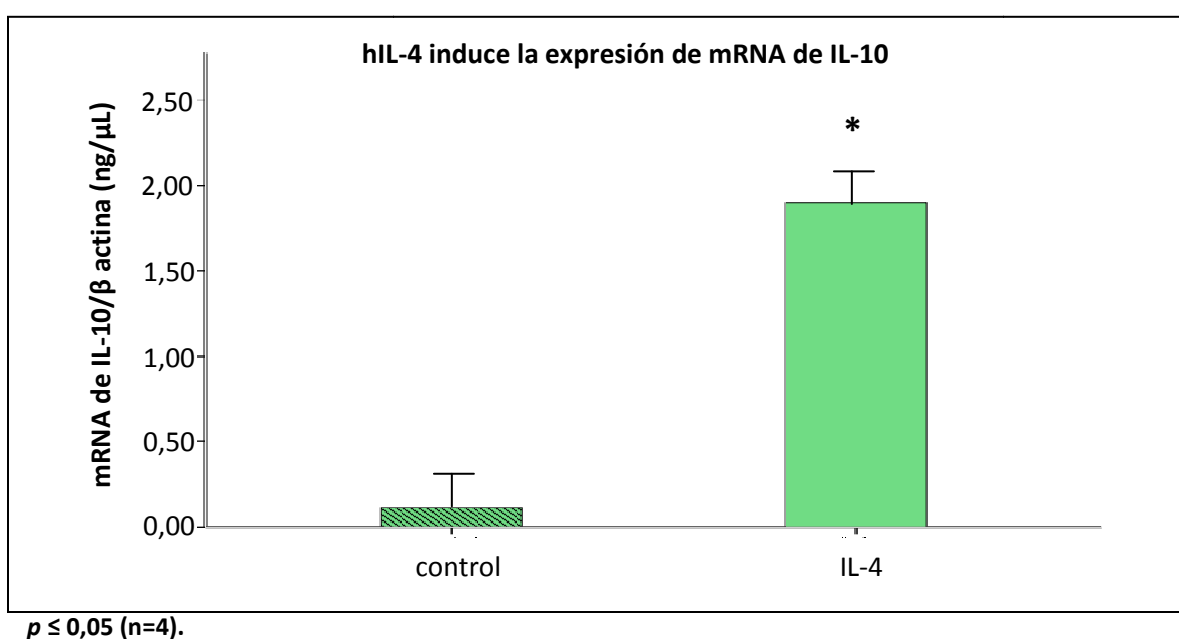


* $p \leq 0,05$ (n=4).

Para determinar si PTX es inductor de fenotipo M2 de macrófagos equinos, se comparó el efecto de PTX 250µg/ml por 90min en la inducción del mRNA de IL-10 con aquel obtenido por un inductor conocido de fenotipo M2 (IL-4 20ng/ml por 18h

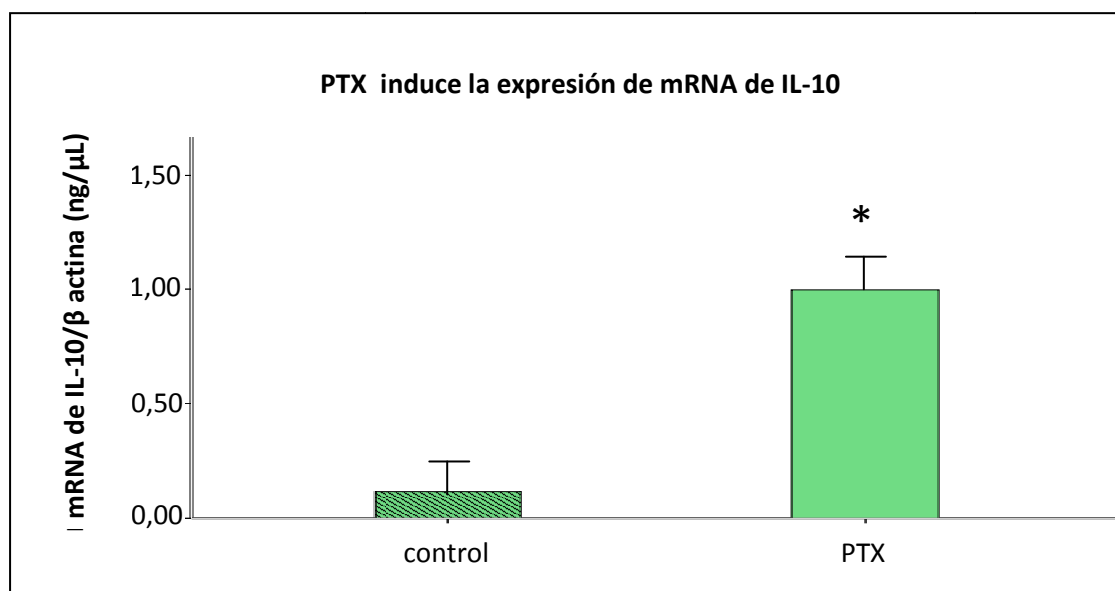
(29)). Primero, valoramos el efecto de hIL-4 en la inducción de mRNA de IL-10 en células equinas y tal como se observa en la figura 19, cuando las células equinas fueron cultivadas en presencia de hIL-4 se observó un incremento significativo en el contenido celular del mRNA de eqIL-10 ($p=0,0072$).

FIGURA 19:- Efecto de IL-4 sobre la expresión de mRNA de IL-10 en células equinas derivadas de PBMC



A continuación, evaluamos si PTX 250 μ g/ml por 90min por si sola podría modificar el contenido celular del mRNA de eqIL-10 en células equinas. Como se observa en la figura 20, hubo un aumento significativo en el contenido celular de mRNA de eqIL-10 ($p=0,028$). Sin embargo, al comparar la magnitud del incremento de >IL-10 inducido por IL-4 y PTX, se observó que dicho incremento fue similar entre ellos, es decir, no hay diferencia significativa entre los valores alcanzados por PTX y los alcanzados por hIL-4.

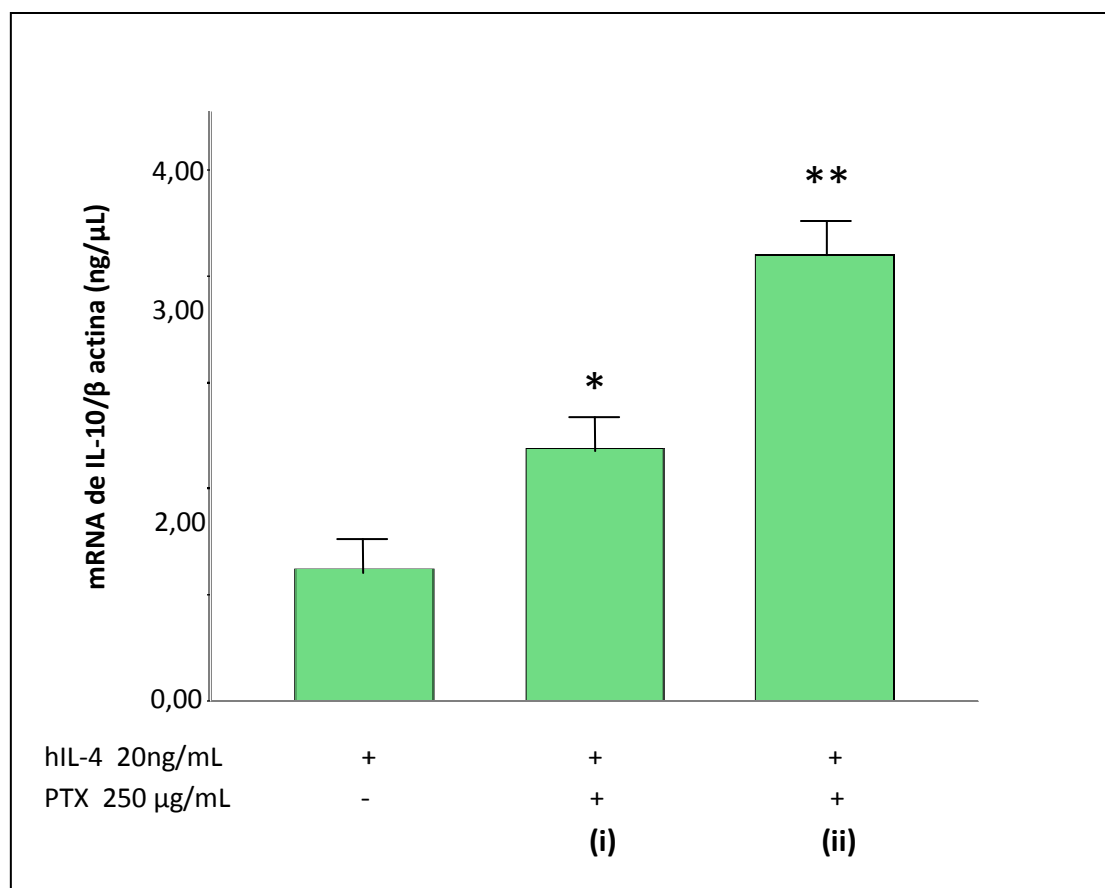
FIGURA 20.- Efecto de PTX sobre la expresión de mRNA de IL-10 en células equinas derivadas de PBMC



* Significa $p \leq 0,05$ (n=4).

Posteriormente, evaluamos si PTX podría modificar la expresión de mRNA de eqIL-10 en células cultivadas con hIL-4. Para ello, utilizando dos estrategias: (i) células equinas cultivadas con hIL-4 (20ng/ml) y PTX 250μg/ml por 18h y (ii) células equinas cultivadas con hIL-4 (20ng/ml) por 18 horas y luego tratadas con PTX 250μg/ml por 90min (figura 21). Independiente de la estrategia utilizada, en ambas condiciones se observó un incremento significativo del contenido celular del mRNA de eqIL-10 cuando al tratamiento con hIL-4 se le adicionaba PTX ($p=0,029$ y $p=0,015$ respectivamente), siendo este aumento significativamente mayor en la condición (ii) (figura 21).

FIGURA 21.- Efecto de PTX sobre la expresión de mRNA de eqIL-10 en células equinas derivadas de PBMC estimuladas con hIL-4

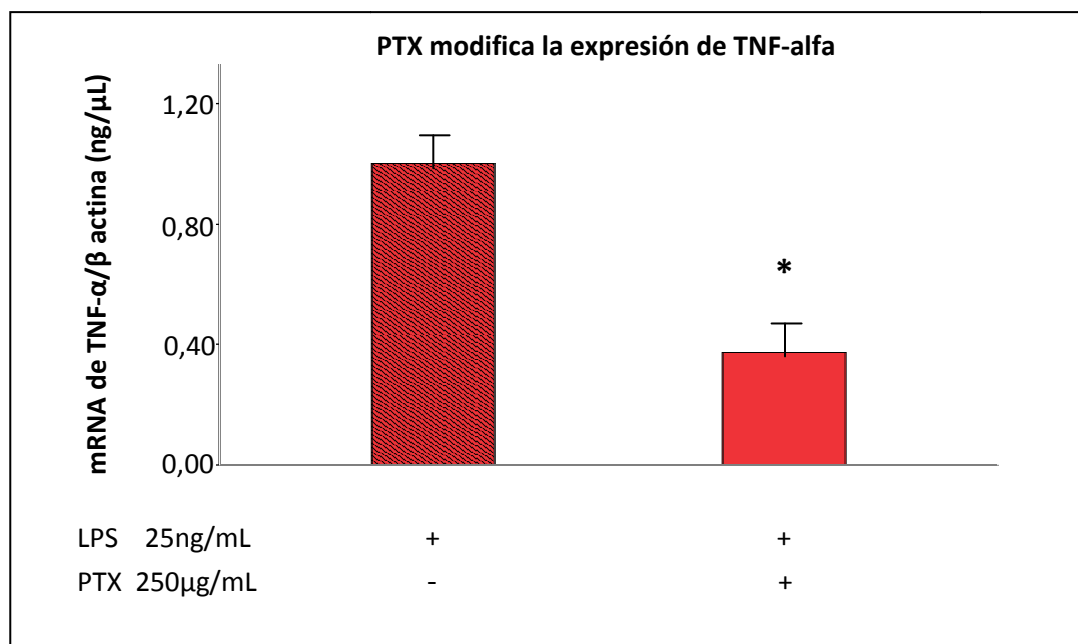


* Significa $p \leq 0,05$ (n=4).

OE4: Determinar, si PTX inhibe la expresión del fenotipo M1 de macrófagos generados en respuesta a un inductor de macrófagos M1 conocido.

Luego, para dar cumplimiento al OE4 células equinas fueron cultivadas por 18h con LPS (25ng/mL) y luego tratadas con PTX 250μg/mL por 90min. Como se muestra en la figura 22, se observó una disminución significativa del contenido del mRNA de TNF-α en presencia de PTX ($p=0,026$).

FIGURA 22.- Efecto de PTX sobre la expresión de mRNA de TNF- α en células equinas estimuladas con LPS.



* $p \leq 0,05$ (n=4).

OE5: Determinar en modelo equino, si PTX modifica el fenotipo de macrófagos M1 a macrófagos M2.

Finalmente, para dar cumplimiento al OE5, nuestro trabajo consistió en determinar además si PTX podría favorecer el fenotipo M2. Para ello, utilizando dos estrategias: (A) células equinas cultivadas con LPS (25ng/ml) y PTX 250μg/ml por 18h y (B) células equinas cultivadas con LPS (25ng/ml) por 18 horas y luego tratadas con PTX 250μg/ml por 90min, se cuantificó el mRNA de eqIL-10. Como se aprecia en la figura 23, independiente de la estrategia utilizada, PTX induce un incremento significativo del mRNA de eqIL-10 en células previamente cultivadas con LPS ($p=0,05$), sugiriendo un efecto modulador del fenotipo de macrófagos con supresión del fenotipo M1 con inducción de la polarización hacia el fenotipo M2.

DISCUSIÓN

En este estudio, se evaluó la acción de PTX en células RAW 264.7 y en células equinas derivadas de PBMC y su efecto en la polarización de macrófagos por medio de la cuantificación de citoquinas marcadoras de los fenotipos M1 (TNF- α) y M2 (IL-10).

Nuestros resultados muestran que en células RAW 264.7, estimuladas con un inductor del fenotipo M1 de macrófagos (LPS) y posteriormente tratadas con PTX, existe una menor expresión de mRNA de TNF- α lo que se obtuvo a una concentración de PTX de 250 μ g/ml por 60 minutos de tratamiento (figura 14). Esto concuerda con lo observado por Loftis en 1997 quien trabajó con este mismo tipo celular pero con dosis mayor de PTX (1000 μ g/ml), por el mismo tiempo de exposición y analizando la expresión de la citoquina secretada en el sobrenadante del cultivo por técnica de ELISA (11). Nuestro resultado permite agregar que el efecto de PTX observado previamente en la secreción de la proteína TNF- α corresponde a un efecto que incluye al mRNA de ésta sin poder precisar si esto se relaciona con menor tasa de síntesis del mRNA o modificaciones en su vida media.

También observamos que en células RAW 264.7 cultivadas con un inductor del fenotipo M1 de macrófagos (LPS) y posteriormente tratadas con PTX durante distintos tiempos de exposición, los efectos de PTX sobre el mensajero de TNF- α requiere de al menos, 60 minutos de exposición a éste (figura 15). Interesantemente, aún cuando observamos modificaciones en el contenido del mRNA de TNF- α a los 60, 90 y 120 minutos en relación al control, el análisis

estadístico no mostró diferencias significativas en los efectos observados entre estos tiempos de exposición (figura 15). Nos propusimos evaluar si los cambios observados en el marcador del fenotipo M1, podrían también incluir al fenotipo M2 para lo cual cuantificamos el contenido del mRNA de IL-10, y, sorprendentemente, sí se observó una diferencia significativa en la expresión de esta citoquina a los 60 y 90 minutos de exposición a PTX en relación al control (figura 16). Es decir, PTX es capaz de inhibir el mRNA marcador del fenotipo M1 a 60 minutos de exposición y, a su vez y en forma más tardía, incrementar la expresión del mRNA del marcador de fenotipo M2 (IL-10). Este hallazgo de disminución del contenido de TNF- α e incremento del contenido de IL-10 a tiempos diferentes, nos hizo plantear que probablemente PTX podría tener dos efectos sobre la polarización de los macrófagos: 1) un efecto supresor del fenotipo M1 y 2) un efecto inductor sobre el fenotipo M2 con una diferencia temporal de expresión de ambos efectos. Por tanto, con la idea de capturar ambos efectos de PTX, decidimos utilizar 90min como el tiempo de trabajo para los experimentos siguientes.

Los efectos de PTX observados en células RAW en cultivo, podrían deberse a que PTX inhibe directamente la fosforilación de IKK evitando la traslocación de NF κ B, principal actor en la expresión de mRNA de TNF- α (21) mientras que el aumento de la expresión de mRNA de IL-10 requeriría alcanzar una cierta concentración basal de cAMP para la activación de la vía cAMP-PKA-CREB, dado por la acción inhibitoria de PTX sobre la enzima fosfodiesterasa (35) (Figura 24).

En el presente estudio, las células equinas que fueron estimuladas con LPS y luego tratadas con PTX mostraron una disminución de la expresión de mRNA de TNF- α (figura 22). Este resultado es similar a lo observado por nosotros y por otros autores en células RAW 264.7 (24, 46), y también a lo descrito para una línea celular humana de linfocitos humanos (20). Esto podría deberse a que la activación de la vía de señalización cAMP-PKA-CREB suprime la expresión de mRNA TNF- α al unirse CREB al sitio CRE para TNF- α (19). Por otro lado, se ha planteado que al mismo tiempo, PTX disminuye la fosforilación y activación de IKK citoplasmático y de I κ B, resultando en una disminución de la traslocación de NF κ B (21) (Figura 24). Sin embargo, estos resultados contrastan con lo observado en PBMC bovinos tratados con PTX, donde no se evidenció una disminución de la expresión de mRNA de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) (47). Estas diferencias podrían deberse a que las concentraciones utilizadas por estos autores fueron diferentes (0.0005 a 5 μ g/ml) y muy inferiores a las utilizadas por nosotros y por otros (23). Los datos obtenidos en el presente estudio, sugieren que PBMC equinos estimulados por LPS en presencia de PTX inhiben la expresión del fenotipo M1.

Con estos resultados, nos propusimos evaluar si PTX pudiese tener algún rol en la expresión del fenotipo M2 de los macrófagos equinos. Para ello, analizamos la expresión del mRNA de IL-10 y como se muestra en la figura 20, observamos que PTX en PBMC equinos, aumenta la expresión de mRNA de IL-10 y además potencia la expresión de esta citoquina cuando son estimulados con hIL-4, un inductor conocido de este fenotipo celular (figura 21). El aumento de la expresión de IL-10 en presencia de hIL-4 concuerda con lo observado por Liu, 2013, quien trabajó en células RAW 264.7 estimuladas con *mouse* IL-4 en la misma concentración a la

utilizada en el presente estudio (13). Nuestra interpretación es que en este efecto de PTX participaría la vía de señalización cAMP-PKA-CREB de modo que CREB se uniría al sitio CRE para IL-10 y aumentaría la expresión de mRNA para ella (20) (Figura 24).

Por otra parte, el efecto potenciador de PTX con IL-4 observada en nuestros resultados (figura 21) podría corresponder a que en forma independiente de PTX, la vía de señalización para IL-4 activa y trasloca a p38 y ERK favoreciendo directamente la diferenciación hacia el perfil M2 de los macrófagos (11). Estos resultados indicarían, entonces, que PTX por sí sola es capaz de inducir el fenotipo M2 y, por otra parte, puede potenciar el efecto de otros inductores tales como IL-4.

Dado que PTX es un inhibidor no específico de las fosfodiesterasas (PDE), se puede plantear que los efectos anti-inflamatorios de PTX aquí observados podrían estar explicados por cambios en la concentración intracelular de cAMP y/o cambios en la biodisponibilidad de cGMP. Sin embargo, se sabe que la isoforma de PDE predominante en este tipo celular es la isoforma PDE4 -la mayor isoforma presente en macrófagos- la cual tiene especificidad para cAMP (48,41). La inhibición de PDE4, al promover la acumulación de cAMP activaría la vía de señalización cAMP-PKA-CREB, suprimiendo por este mecanismo la transcripción de TNF- α y a su vez aumentando la expresión de IL-10 (41). De este modo, podría ser efectivamente el incremento de cAMP el mecanismo subyacente a los hallazgos descritos en esta tesis. Dado que este estudio no utilizó inhibidor específico de PDE4, es posible plantear que los efectos observados pudieran ser secundarios al efecto de PTX sobre otras PDEs con incremento de la concentración intracelular de cGMP. Sin embargo, existe antecedentes que señalan que el aumento de cGMP en macrófagos

actuaría como inhibidor de otras PDEs favoreciendo el aumento de cAMP (48) potenciando los efectos biológicos derivados del incremento de cAMP.

Para resolver esta incertidumbre, sería necesario realizar un nuevo estudio utilizando bloqueadores específico para las isoformas específicas para cGMP (40), tales como MBMQ (4- $\{[3,4\text{-}(\text{methylenedioxy})\text{benzyl}]\text{amino}\}$ -6-methoxyquinazoline) bloqueador específico para PDE5 que es capaz de elevar los niveles de cGMP sin alterar los niveles de cAMP (37) y de esta forma cuantificar la expresión de mRNA de TNF- α atribuido a esta vía de señalización, para luego compararlos con los resultados obtenidos con PTX.

Finalmente, con los datos aquí obtenidos se puede afirmar por primera vez que PTX en células equinas derivadas de PBMC estimulados con LPS, inhibe la actividad de macrófagos del fenotipo M1 y favorece la expresión del fenotipo M2, lo cual puede explicar el efecto benéfico observado en procesos inflamatorios agudos y respaldaría su utilización clínica en cuadros de Laminitis.

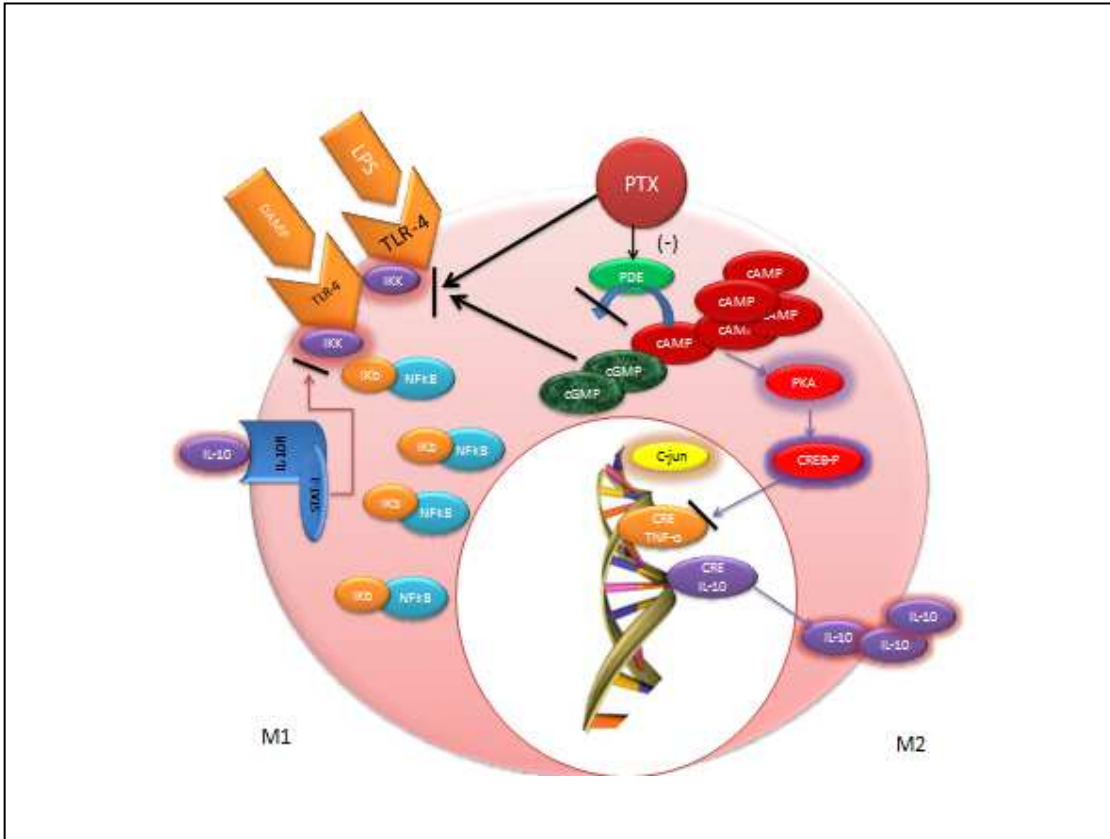


Figura 24. Esquema propuesto de la acción de PTX

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en la presente investigación permite sostener que PTX:

- Disminuye el contenido de mRNA TNF-alfa inducido por LPS
- Aumenta el contenido de mRNA IL-10
- Aumenta el contenido de mRNA IL-10 inducido por hIL-4
- Aumenta el contenido de mRNA IL-10 en células tratadas con LPS

En suma, Pentoxifilina en células equinas efectivamente inhibe la actividad de macrófagos equinos del fenotipo M1 y direcciona la diferenciación en favor del fenotipo M2.

RELEVANCIA CLÍNICA

La inducción del fenotipo M2 a partir del fenotipo M1 dado por la Pentoxifilina, resulta en una adecuada posibilidad de tratamiento frente a patologías que cursen con procesos inflamatorios agudos, favoreciendo la reparación de los tejidos dañados y restableciendo el equilibrio entre las células pro- inflamatorias y anti-inflamatorias en favor de la reparación y cicatrización.

Cabe destacar que este trabajo resulta además relevante al demostrar los efectos de PTX una vez iniciada la injuria inductora de la respuesta pro-inflamatoria.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO:

1. Las células fueron obtenidas de caballos clínicamente sanos
2. La metodología para la obtención de macrófagos a partir de PBMC equinos se realizó analizando las características morfológicas observadas durante el cultivo celular atribuidas a la capacidad de los monocitos de adherirse al plástico. Posiblemente otras aproximaciones al reconocimiento de monocitos tales como citometría de flujo con marcadores de superficie (cell sorting) y/o el uso de técnicas como los lechos magnéticos (magnetics beds), podrían mejor definir las células estudiadas.

PROYECCION

1.- Trabajar con muestras de caballos que presenten un cuadro inflamatorio de curso agudo tal como la laminitis, y en las células obtenidas:

- caracterizar su fenotipo
- tratarlas en ensayos ex vivo con PTX

2.- Realizar estudios comparativos con otras drogas conocidas por sus características anti-inflamatorias, como AINE's o corticoides valorando su efecto en la polarización de macrófagos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Palomo I., Pereira J., Koenig C. Células y Órganos del Sistema Inmune. En Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica. e-book Editorial Universidad de Talca (2009): 65-86
- 2.- Serbina N.V., Jia T., Hohl T.M., Pamer E.G. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. Annual Review of Immunology. (2008) 26: 421-452
- 3.- Yona S., Jung S. Monocytes: subsets, origins, fate and functions. Current Opinion in Hematology (2010)17:53-59
- 4.- Shi Ch., Pamer E.G. Reviews: Monocyte recruitment during infection and inflammation. Reviews/Immunology (2011)11: 762-774. doi:10.1038/nri3070
- 5.- Gordon S., Taylor P.R. Reviews: Monocyte and Macrophage Heterogeneity. Nature Reviews|Immunology (2005) 5: 953-963
- 6.- Duque M.A., Rojas M. Revisión: Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. Inmunología (2007) 26(2): 73-86.
- 7.- Dudley Charles. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. Frontier in Immunology (2015) vol6: 1-12. doi: 10.3389/fimmu.2015.00212.
- 8.- Strauss-Ayali D., Conrad S.M., Mosser D.M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. Journal of Leukocyte Biology (2007) 82: 244-252
- 9.- Mantovani A., Sica A. Macrophages Polarization Comes of Age. Immunity (2005) 23: 344-346. doi: 10.1016/j.immuni.2005.10.001.
- 10.- Biswas S., Mantovani A. Orchestration of Metabolism by Macrophages. Cell Metabolism (2012) 15: 432-437.
- 11.- Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. The Journal of Clinical Investigation. (2012) 122(3): 787-795.
- 12.- Mantovani A., Locati M. Orchestration of macrophage polarization. blood (2009) 114(15): 3135-3136

- 13.- Liu Chao-Ying, Xu Juan-Ying, Shi Xiao-Yan, Huang Wei, Ruan Ting-Yan, Xie Ping and Ding Jun-Li M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Laboratory Investigation* (2013) 93, 844–854
- 14.- Saraiva, M. and O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews | Immunology* (2010) 10: 170-181
- 15.- Jimenez-Garcia L.; Herranz S., Luque A.; Hortelano S. Critical role of p38 MAPK in IL-4-induced alternative activation of peritoneal macrophages *European Journal of Immunology*. (2015) 45: 273–286
- 16.- Zhao X.N., Li Y.N. and Wang Y.T. Interleukin-4 regulates macrophage polarization via the MAPK signaling pathway to protect against atherosclerosis 1. *Genetics and Molecular Research* (2016) 15 (1): gmr.15017348:1-9
- 17.- Roszer Tamás. Review: Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediator of Inflammation* (2015) Article ID 816460, 16 pages. doi.org/10.1155/2015816460.
- 18.- Goldsmith M., Avni D., Levy-Rimler G., Mashiach R., Ernst O., Levi M., Webb B., Meijler M., Gray N., Rosen H., Zor T. Acetamide-1-phosphate analogue, PCERA-1, simultaneously suppresses tumor necrosis factor- α and induces interleukin-10 production in activated macrophages. *Immunology* (2008) 127: 103-115.
- 19.- Avni D., Philosoph A., Meijler M., Zor T. The ceramide-1-phosphate analogue PCERA-1 modulates tumor necrosis factor- α and interleukin-10 production in macrophages via the cAMP-PKA-CREB pathway in a GTP-dependent manner. *Immunology* (2009) 129:375-385.
- 20.- Benbernou N., Esnault S., Shin H.C.K., Fekkar H., Guenounou M. Differential regulation of INF- γ , IL-10 and inducible nitric oxide synthase in human T cell by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. *Immunology* (1997) 91: 361-368.
- 21.- Constantini T.W., Loomis W.H., Putnam J.G., Kroll L., Eliceiri B.P., Baird A., Bansal V., Coimbra R. Pentoxifylline Modulates Intestinal Tight Junction Signaling After Burn Injury: Effects on Myosin Light Chain Kinase. *Journal of trauma*. (2009) 66(1): 17-25. doi: 10.1097/TA.0b013e318191bb1f.
- 22.- Brodsky M., Halpert G., Albeck M., Sredni B. The anti-inflammatory effects of the tellurium redox modulating compound ,AS101, are associated with regulation of NF-

kB signaling pathway and nitric oxide induction in macrophages. *Journal of Inflammation* (2010) 7:1-8

23.- Chang Y-C., Tsai M-H, Sheu WH-H, Hsieh S-C, Chiang A-N. The Therapeutic Potential and Mechanisms of Action of Quercetin in Relation to Lipopolysaccharide-Induced Sepsis In Vitro and Vivo. *PloS ONE* (2013) 8(11):e80744. doi:10.1371/journal.pone.0080744.

24.- Loftis, L., Meals E., English B.K. Differential Effects of Pentoxifylline and Interleukin-10 on Production of Tumor Necrosis Factor and Inducible Nitric Oxide Synthase by Murine Macrophages. *The Journal of Infectious Diseases* (1997) 175:1008-11.

25.- Mata-Espinoza D.A., Hernández-Pando R. Interferón gamma; aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Revista de Investigación Clínica* (2008) 60(5): 421-431

26.- Robinson N.E., Sprayberry K.A. Patogénesis de la laminitis y Manejo farmacológico de la laminitis. En: *Terapéutica Actual en Medicina Equina* ed. Intermédica Bs. Aires (2012): 604-611

27.- Godoy, A., García A. Infosura en Equinos. *Avances en Ciencias Veterinarias* (2011) 26(1 y2): 11-26

28.- Faleiros R.R., Nuovo G.J., Belknap J.K Calprotectin in Myeloid and Epithelial Cells of Laminae from Horses with Black Walnut Extract-Induced Laminitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* (2009) 23:174-181.

29.- Bianchi M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* (2007) 81: 1-5

30.- Liska D., Akucewich L., Marsella R, Maxwell L., Barbara J., Cole C. Pharmacokinetics of pentoxifylline and its 5-hydroxyhexyl metabolite after oral and intravenous administration of pentoxifylline to healthy adult horses. *American Journal of Veterinary Research*. (2006) 67(9):1621-7.

31.- Sullivan G., Carper H., Novick W., Mandell G. Inhibition of the Inflammatory Action of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor (Alpha) on Neutrophil Function by Pentoxifylline. *Infection and Immunity* (1988) 1722-1729.

- 32.- Weiss D.J., Geor R.J., Burris S.M., Smith II C.M. Effects of Pentoxifylline on Equine Neutrophil Function and Flow Properties. *Canadian Journal of Veterinary Research*.(1992) 56: 313-317.
- 33.- Gonzalez G. Pentoxifilina: Revisión de sus Características Farmacológicas y Utilización en la Práctica Clínica. *Flebología y Linfología* (2007) 4: 157-220.
- 34.- Samardzic T., Jankovic V., Stosic-Grujicic S., Popadic D., Trajkovic V. Pentoxifylline inhibits the syntesis and INF-Y-inducing activity of IL-8. *Clinical and Experimental Immunology* (2001) 124: 274-281.
- 35.- Trajkovic V., Badovinac V., Popadić D., Hadzic O., Stojkovic M. Cell-specific effects of pentoxifylline on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase mRNA expression. *Immunology* (1997)92: 402-406.
- 36.- Lee In-Ah, Kamba A.; Low D.; Mizoguch E. World Novel methylxanthine derivative-mediated anti-inflammatory effects in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology* (2014) February 7; 20(5): 1127-1138 ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)
- 37.- Haddad J., Land S., Tarnow-mordi W., Zembala M., Kowalczyk D., Lauterbach R. Immunopharmacological Potential of Selective Phosphodiesterase Inhibition. II. Evidence for the Involvement of an Inhibitory-kB/Nuclear Factor-kB-Sensitive Pathway in Alveolar Epithelial Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2002) 300(2): 567–576.
- 38.- Elhwuegi A.S. The Wonders of Phosphodiesterase-5 Inhibitors: A Majestic History. *Annals of Medical and Health Sciences Research* (2016) 6(3): 139–145.
- 39.- Boswell-Smith V., Spina D., Page P. Phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology* (2006) 147: 252–257.
- 40.- Keravis T. and Lugnier C. REVIEW Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *British Journal of Pharmacology* (2012) 165: 1288–1305.
- 41.- Perez-Aso M., Montesinos MC., Mediero A., Wilder T, Schafer P., Cronstein B. Apremilast, a novel phosphodiesterase 4(PDE4) inhibitor, regulates inflammation through multiple cAMP downstream effectors. *Arthritis Research & Therapy* (2015) 17:249.

- 42.- García F.A., Farias J., Queiroz T., Goncalves T., Reis C.H., Santos G., de Castro G.A., de Barros G.S. Pentoxifylline reduces the inflammatory process in diabetics rats: relationship with decreases of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Inflammation* (2015) 12:33. doi 10.1186/s12950-015-0080-5.
- 43.- Bessier H., Gligal R., Djaldetti M., Zahavi I. Effect of Pentoxifylline on the Phagocytic Activity, cAMP Levels, and Superoxide Anion Production by Monocytes and Polymorphonuclear Cells. *Journal of Leukocyte Biology* (1986) 40: 747-754.
- 44.- Mattson E., Van Dijk H., Van Kessel K., Verhoef J., Fleer A., Rolof J. Intracellular Pathway Involved in Tumor Necrosis Factor- α Release by Human Monocytes on Stimulation with Lipopolysaccharide or Staphylococcal Peptidoglycan are Partly Similar. *The Journal of Infectious Diseases* (1996) 173: 212-8
- 45.- He Z., Zhang H., Yang Ch., Zhou Y., Zhou Y., Han G., Xia L., Ouyang W., Zhou F., Zhou Y., and Xie C. The interaction between different types of activated RAW 264.7 cells and macrophage inflammatory protein-1 α . *Radiation Oncology* (2011)6:86 (<http://www.ro-journal.com/content/6/1/86>)
- 46.- Han J, Thompson P., and Beutler B. Dexamethasone and Pentoxifylline Inhibit Endotoxin-induced Cachectin/Tumor Necrosis Factor Synthesis at Separate Points in the Signaling Pathway. *Journal of Experimental Medicine* (1990) 172: 391-394.
- 47.- Kiku Y., Matsuzawa H., Ohtsuka H., Terasak N., Fukuda S., et al Effects of Chlorpromazine, Pentoxifylline and Dexamethasone on mRNA Expression of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokines in Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal Veterinary Medicine Science* (2002) 64(8): 723-726.
- 48.- Witwicka H., Kobińska M., Siednienko J., Mitkiewicz M., Gorczyca W. Expression and activity of cGMP-dependent phosphodiesterases is up-regulated by lipopolysaccharide (LPS) in rat peritoneal macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta* (2007) 1773: 209–218.