



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

**HOMEOSTASIS DEL TEJIDO CONJUNTIVO
HEPATICO: LAS CELULAS DE KUPFFER**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

JUAN GERARDO VALADEZ SANCHEZ

México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fué realizada bajo la dirección del Dr. Marcos Rojkind Matluk, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

A mis padres, Raquel y Juan.

A mis hermanos, Margarita, Patricia y Daniel.

A Rocio.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio 25 del Departamento de Bioquímica:

Margarita Rosas, Francisco Cruz, María Eugenia Torres, Javier Cordero, Jorge Cerbón, Jesús Arellano, Teresa Olguín, Gabriel Vargas, Juan Armendáriz, José Luis Rosales, Josefina Quiroga, Alfredo Lopez, Lourdes Ponce, Claudia Soto, Patricia Greenwell, Bertha Jimenez y Don Agus.

Agradezco a mis compañeros del Grupo Piloto del Plan Modular de la Carrera de Biología en la E.N.E.P. Iztacala:

Rocio Zamorano, Jorge Calvo, Arturo Ponce, Edith Garay, Gabriela Olmedo, Aurora Candelario, Refugio García, Pilar Méndez, Rafael Arreola, Lourdes Ruíz, Norma Pernas, Miguel Vargas, Juan Carlos Martínez, José Antonio Enciso, Jorge Dominguez, Armando García, María Eugenia Nuñez, Lilia Hernandez, Minerva de la Vega, Juan Felipe García, Alejandra Ramos, Salvador Rojas, Jesús Rosiles y Ricardo Gonzalez.

Agradezco a mis profesores del Plan Modular de la Carrera de Biología en la E.N.E.P. Iztacala y en especial a Ignacio Peñaloza Castro.

INDICE

	Página
RESUMEN.	1
I- INTRODUCCION.	2
1- El hígado, estructura y función.	2
A- Aspectos generales.	2
B- La función hepática.	2
C- Parénquima y estroma.	3
a- Parénquima.	3
a.1- Células parenquimales o hepatocitos.	3
b- Estroma.	4
b.1- Células sinusoidales o no parenquimales.	4
b.2- Las colágenas.	6
b.3- Glicoproteínas no colagénicas.	6
b.4- Glicosaminoglicanos y proteoglicanos.	9
D- Relación parénquima/estroma.	9
E- Contribución celular a la síntesis de componentes de la matriz extracelular.	10
2- La cirrosis hepática.	12
A- Definición y agentes que la provocan.	12
B- Fibrogénesis.	12
a- La matriz extracelular en el hígado cirrótico.	12
b- Depósito de colágena.	13
c- Las células involucradas.	13
d- Mediadores químicos de la fibrogénesis hepática.	16
d.1- Activación de las células de Kupffer.	17
d.2- Activación de los linfocitos.	19
3- Prevención y tratamiento de la fibrosis hepática.	20
II- OBJETIVO.	23
III- MATERIALES Y METODOS.	24
1- Reactivos y materiales.	24
2- Material biológico.	24
3- Diseño experimental.	24
A- Grupo control.	24
B- Tetracloruro de carbono.	24

	Página
C- Colchicina-CCl ₄	25
D- Colchicina.	25
E- Aceite mineral.	25
4- Aislamiento de las células hepáticas no parenquimales.	25
5- Estimación de la recuperación celular.	26
6- Técnicas fagocíticas.	27
A- Fagocitosis de eritrocitos.	27
B- Fagocitosis de carbón coloidal.	27
C- Peroxidasa endógena.	27
7- Obtención del medio condicionado.	28.
8- Cultivo de fibroblastos.	28
9- Ensayo de proliferación de fibroblastos.	29
IV- RESULTADOS.	30
1- Aislamiento de células no parenquimales de hígados normales y tratados con CCl ₄ .	30
2- Efecto del CCl ₄ y la colchicina sobre la actividad fagocítica de las células hepáticas no parenquimales y de las células inflamatorias.	32
3- Fagocitosis de eritrocitos y carbón coloidal.	35
4- Cuantificación de la fracción celular involucrada en la fagocitosis.	37
5- Proliferación de fibroblastos.	39
V- DISCUSION.	43
VI- REFERENCIAS.	51

RESUMEN.

La cirrosis hepática puede ser considerada como una alteración de los mecanismos homeostáticos que mantienen las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Los mecanismos que mantienen la homeostasis y por tanto, que controlan la proliferación de los fibroblastos y la síntesis de colágena, son desconocidos. En el presente trabajo se realizaron experimentos con el fin de estudiar el papel de las células de Kupffer en la regulación de la proliferación de los fibroblastos hepáticos y estudiar las propiedades antifibrogénicas de la colchicina.

La fracción no parenquimal de un hígado intoxicado con CCl_4 , contenía seis veces más células con propiedades fagocíticas que un hígado normal. La colchicina administrada en dosis farmacológicas durante una semana previo a la intoxicación previno éste aumento. Los cultivos de células provenientes de hígados normales conteían pocos fibroblastos, mientras que aquellos provenientes de animales tratados con CCl_4 contenían muchos. La remoción de las células adherentes obtenidas de hígados normales favoreció la proliferación de los fibroblastos en cultivo. Finalmente, el medio condicionado proveniente de hígados normales, inhibió la proliferación de fibroblastos hepáticos en cultivo, mientras que el medio condicionado proveniente de animales tratados con CCl_4 la estimuló.

Los resultados obtenidos sugieren que las células de Kupffer normales controlan la proliferación de los fibroblastos y que la población de células inflamatorias que arriba al hígado en respuesta a la lesión estimula la proliferación de los fibroblastos. La colchicina tiene un efecto antiinflamatorio que inhibe la entrada de células inflamatorias al hígado dañado y puede prevenir la fibrosis hepática por este mecanismo.

I- INTRODUCCION.

1-El hígado, estructura y funciones.

A- Aspectos generales.

La estructura del hígado, su organización como tejido, su composición celular, así como las características citológicas y citoquímicas de los diversos tipos celulares que lo componen, reflejan su diversidad y alta especialización de funciones como órgano. El hígado es, tanto una glándula endócrina y exócrina que secreta sales biliares al lumen intestinal, como una glándula cerrada que produce gran variedad de proteínas sanguíneas y lípidos. Además, el órgano vigila y controla, por almacenamiento e intercambio, la concentración en el plasma de una multitud de pequeñas moléculas involucradas en el metabolismo; elimina ciertas hormonas y drogas y filtra materiales de varios orígenes y dimensiones del torrente sanguíneo. Las operaciones secretorias, metabólicas y fagocíticas se llevan a cabo amplia e independientemente bajo circunstancias no patológicas y correlacionan estrechamente con las diversas especies celulares del órgano.

B- La función hepática.

El hígado está compuesto por diversos elementos celulares que interactúan unos con otros y que están embebidos en una matriz extracelular compuesta por colágenas, glicoproteínas no colagénicas y glicosaminoglicanos (Rojkind y Ponce-Noyola, 1982). Cada tipo celular en el hígado lleva a cabo diferentes funciones y produce metabolitos que son usados por la misma especie celular y/o por otras células localizadas a lo largo de un gradiente sinusoidal. Además de su contribución metabólica, cada célula participa con intensidad variable en la síntesis, depósito y remodelación de la matriz extracelular. Esta matriz juega también un importante papel en la regulación de la expresión fenotípica de las células y tiene una fuerte influencia en el potencial metabólico de las células hepáticas. La suma de todos estos factores genera un grupo de reacciones bioquímicas llamado "la función hepática".

C- Parénquima y estroma.

Se ha establecido que los hepatocitos ocupan aproximadamente el 80 % del volumen hepático total en hígados humanos y de rata (Rohr y Col., 1976), pero mientras que en el hígado humano suman el 80 % del número celular total (Gates y Col., 1961), en la rata sólo vienen a ser el 60 % aproximadamente (Daoust, 1958); el resto lo componen las células de los ductos biliares (alrededor de un 2 %) así como células sinusoidales y tejido conectivo (20 a 30 %).

Hay cuatro tipos de células no parenquimales presentes en el hígado normal: células endoteliales, células de Kupffer, células de Ito y fibroblastos (Miyai, 1979). Las tres primeras están estrechamente relacionadas con la estructura de los capilares sinusoidales, mientras que la última está presente en el tejido conectivo de la cápsula, los espacios porta y próximas a las venas hepáticas. Durante el desarrollo de la fibrosis hepática, además de las variaciones en el número de los tipos celulares mencionados, aparece un nuevo tipo celular: el miofibroblasto (Majno, 1979).

El espacio entre la cubierta endotelial del sinusoides y los hepatocitos subyacentes es conocido como espacio de Disse o espacio perisinusoidal. El sinusoides normal está demarcado por una capa simple de células endoteliales y ocasionalmente por células de Kupffer; las células de Ito o adipocitos están presentes generalmente en el espacio perisinusoidal.

a- Parénquima.

a.1- Células parenquimales o hepatocitos.

Los hepatocitos son las células más abundantes del hígado, así mismo, son las células responsables de la mayoría de las funciones específicas del hígado que, ya se dijo, es una glándula exócrina debido a que los hepatocitos secretan sales biliares al canalículo y son acarreadas hacia el sistema de ductos al intestino. Así mismo es considerado una glándula endócrina ya que secreta sustancias útiles al torrente sanguíneo; dichas sustancias también son producidas por los hepatocitos. La síntesis de glucógeno y la secreción de glucosa son dos funciones típicas del hepatocito. Los hepatocitos sintetizan

y secretan a la sangre albúminas, fibrinógeno y la mayoría de las globulinas, así como otras proteínas relacionadas con la coagulación. Los hepatocitos, desde luego, no producen las inmunoglobulinas, éstas son sintetizadas por las células plasmáticas. Los hepatocitos también controlan el nivel de lípidos en la sangre através de la síntesis y degradación de complejos lipoproteicos. Otra función de los hepatocitos involucra transformaciones y/o conjugaciones que ocasionan la destoxificación de ciertos productos indeseables, que han sido absorbidos por el intestino o formados en el cuerpo, ya que podrían causar efectos dañinos. Otra característica importante es que éstas células producen y secretan colagenasa (Sunada y Nagai, 1983; Rojkind y Rosas, datos no publicados).

b- Estroma.

b.1- Células sinusoidales o no parenquimales.

Las células de Kupffer son los macrófagos del hígado y se les puede distinguir con certeza de las células endoteliales por su tamaño más grande y por su superficie externa irregular, que es característica por poseer múltiples pliegues y ocasionalmente presenta microvellosidades (Motta y Porter, 1974; Grisham y Col., 1976) Su citoplasma es abundante y contiene una rica y heterogenea población de vacuolas fagocíticas, muchas mitocondrias pequeñas y un retículo endoplásmico rugoso relativamente bien desarrollado, complejos de Golgi, microtúbulos, microfilamentos e inclusive centriolos (Tanikawa, 1968; Wisse, 1974). Presentan reacción positiva a la peroxidasa endógena en la región perinuclear y cerca del retículo endoplásmico rugoso (Fahimi, 1970; Widmann y Col., 1972; Wisse, 1974). Estas células fagocitas ávidamente, característica que es evidente cuando se observa su citoplasma bajo el microscopio electrónico de transmisión. Morfológicamente no se han descrito transiciones entre las células de Kupffer y las células endoteliales. Parece más bien que las células de Kupffer se originan de una población celular diferente proveniente de la médula ósea, mientras que las células endoteliales probablemente tienen un origen local (Gale y Col., 1978).

Ito y Nemoto en 1952 fueron los primeros en describir a las células que almacenan grasa, pero su existencia ha sido repetidamente confirmada por otros investigadores (Nakane, 1963; Bronfermajer y Col., 1966; Ito y Shibasaki, 1968; McGee y Patrick, 1972). Estas células están localizadas en el espacio de Disse, generalmente en las interrupciones perisinusoidales. Las células de Ito son también conocidas como lipocitos o células que almacenan lípidos debido a que contienen varios depósitos de lípidos limitados por una membrana simple. Las células de Ito no fagocitan ávidamente, pero poseen muchas vesículas pinocíticas. Actualmente se les considera almacenes de elementos, fuentes de abastecimiento para las células endoteliales y potenciales fuentes de fibras de colágena dentro del lóbulo hepático (McGee y Patrick, 1972; Wake, 1974).

Las células endoteliales no son muy prominentes y forman una barrera casi ininterrumpida en la superficie de los capilares sinusoidales, presentan uniones entre sí (Wisse, 1970, 1972). Contienen escaso retículo endoplásmico rugoso, pocas mitocondrias, ocasionalmente cuerpos densos a los electrones parecidos a lisosomas y microtúbulos; no son notablemente fagocíticas (Rhodin, 1965).

Como ya se dijo anteriormente, durante la fibrosis hepática aparece una nueva especie celular en el hígado, con características de una célula de músculo liso: el miofibroblásto, que fué primeramente descrito en el hígado por Bhathal en 1972 y posteriormente por Rudolph y Col. en el 1979 y en 1980 por Irle y Col. La misma especie celular fué previamente descrita en tejidos granulomatosos y se estableció su papel en la contracción de la cicatriz (Gabbiani y Col., 1971; Majno y Col., 1971).

La quinta especie celular, el fibroblásto, es muy bien conocida y únicamente cabe decir que son células secretorias y como tales contienen abundantes vesículas de retículo endoplásmico rugoso y varios complejos de Golgi bien desarrollados. Estas células secretan principalmente procolágena, mucopolisacáridos y elastina (Ross, 1968).

En el tejido conectivo del hígado se encuentran presentes tres clases de macromoléculas: las colágenas, las glicoproteínas no colagénicas y los glicosaminoglicanos y proteoglicanos. Además se pueden considerar ciertas moléculas que pasan libremente por el flujo sinusoidal y que pueden acumularse en estadios de enfermedad, ya sea por depósito o porque quedan atrapadas en la matriz extracelular anormal.

b.2- Las colágenas.

El contenido total de colágena en un hígado varía de especie a especie, pero se mantiene constante en una misma especie a través de la vida del animal (ver Tabla I). Aunque los hígados de ratas jóvenes, con un peso corporal menor a 50 gr contienen 0.7 ± 0.05 mg/gr de tejido fresco y los hígados de ratas con un peso corporal de más de 400 gr contienen 1.16 ± 0.23 mg/gr de tejido fresco, esas diferencias reflejan cambios en el contenido de agua en el órgano, más que cambios en la proporción de colágenas con respecto a la proteína total (C. Soto y M. Rojkind, datos no publicados).

b.3- Glicoproteínas no colagénicas.

En la matriz extracelular del hígado se hallan presentes varias glicoproteínas, una de ellas ha sido recientemente extraída con ácido acético diluido (Ponce y Col., 1981) y otras han sido demostradas por métodos inmunocitoquímicos (Hahn y Col., 1980b; Carlsson y Col., 1981). Sin embargo, un análisis cuantitativo completo de esas glicoproteínas aún no ha sido realizado. Dos de las glicoproteínas demostradas en el hígado, fibronectina y laminina, tienen una amplia distribución y están presentes en otros tejidos conectivos (Kleinman y Col., 1981; Ruoslahti y Col., 1981). Otras glicoproteínas como la recién descrita hepatonectina, parece tener una distribución más restringida y tiene una localización preferente en el hígado (Ponce y Col., 1981).

La fibronectina juega un papel importante en algunas complejas funciones que tienen gran importancia en la comprensión de las interrelaciones entre el daño hepático, la inflamación y la fibrosis. Esas funciones son: quimiotaxis, fagocitosis, fenómenos de

TABLA I

CONTENIDO DE COLAGENAS EN HIGADOS NORMALES Y CIRROTICOS DE HUMANO Y RATA*

	HUMANO (mg/gr)		RATA (mg/gr)	
	NORMAL	CIRROTICO	NORMAL	CIRROTICO
COLAGENA TOTAL	5.5± 1.6	30.0	0.91± 0.15	8.0
TIPO I	2.0	15.0	0.40	3.2
TRIMERO TIPO I	0.05	0.9	0.03	0.3
TIPO III	2.0	8.0	0.40	3.4
TIPO IV	0.5	7.0	0.06	0.8
TIPO V	0.9	7.0	0.05	0.8

* TOMADO DE ROJKIND Y PONCE NOYOLA (1982).

adhesión celular y control de la expresión fenotípica de algunas células.

QUIMIOTAXIS. La fibronectina ha sido identificada como un factor quimiotáctico para fibroblastos en cultivo (Postlethwaite y Col., 1981). Es producida por muchas células (Vaheri y Col., 1976; Birdwell y Col., 1978; Jaffe y Mosher, 1978; Macarak y Col., 1978; Kurkinen y Alitalo, 1979; Lloyd y Col., 1979; Voss y Col., 1979; Foirdart y Col., 1980) incluyendo macrófagos (Johansson y Col., 1979; Alitalo y Col., 1980; Tsukamoto y Col., 1981) y las propias células de Kupffer (Wahl y Col., 1982). La quimiotaxis de los fibroblastos por la fibronectina es específica ya que concentraciones tan altas como 100 ug/ml no afectan la migración de los monocitos y neutrófilos (Postlethwaite y Col., 1981).

FAGOCITOSIS. La fibronectina es el principal componente opsonico del plasma (Blumenstock y Col., 1978) e incrementa 200 veces la ingestión de partículas de latex cubiertas con gelatina por los macrófagos (Gudewicz y Col., 1980). El mismo grupo de investigadores estableció que la fibronectina no estimula la interlcalización de partículas, sino que sólo promueve su adhesión a la membrana citoplásmica.

ADHESION CELULAR. La adhesión de muchas células, especialmente a colágena es facilitada por la fibronectina (Kumagai y Col., 1979; Murray y Col., 1980; Pearlstein y Col., 1980; Grinnell y Bennett, 1981; Ruoslahti y Col., 1981). No obstante, la fibronectina puede no ser el factor de adhesión para células epiteliales (Kleinman y Col., 1981), y no estimula la extensión de las células epidérmicas en cultivo (Federgreen y Stenn, 1980).

CONTROL DE LA EXPRESION FENOTIPICA CELULAR. La fibronectina altera la expresión fenotípica de algunas células en cultivo. En el caso de las células que producen pequeñas cantidades de colágena en medios libres de suero, como los hepatocitos, la fibronectina adicionada estimula la producción de dicha proteína por dichas células (Foirdart y Col., 1980; Hata y Col., 1980). En cultivos de células que producen un grupo específico de glicosaminoglicanos y colágena en medio libre de suero, como es el caso de los condrocitos, la fibronectina promueve un aumento en la síntesis de

dichas macromoléculas (Pennypacker y Col., 1979; West y Col., 1979; Pennypacker, 1981).

b.4- Glicosaminoglicanos y proteoglicanos.

La biosíntesis, composición y estructura de los glicosaminoglicanos hepáticos han sido estudiadas por diferentes grupos de investigadores (Koizumi y Col., 1967; Akasaki y Col., 1975; Dietrich y Col., 1976; Oldberg y Col., 1979; Prinz y Col., 1980; Ninomiya y Col., 1980, 1981; Kjellén y Col., 1981). Su composición porcentual muestra que el sulfato de heparán es el más abundante. La distribución de glicosaminoglicanos en el hígado es desconocida, sin embargo, el sulfato de heparán está presente en alta concentración en la membrana plasmática de los hepatocitos de rata (Akasaki y Col., 1975; Oldberg y Col., 1979; Kjellén y Col., 1981).

El grupo de Kjellén en 1981, estableció también la presencia de dos tipos de glicosaminoglicanos en el membrana plasmática de hepatocitos y sugieren que las interacciones célula-célula y célula-matriz pueden establecerse a través del sulfato de heparán. Más aún, éste glicosaminoglicano insertado en la membrana posibilita la continuidad bioquímica entre la matriz extracelular y la membrana plasmática y podría explicar, en parte, la estrecha relación funcional entre el citoesqueleto, la membrana plasmática y la matriz extracelular. Es posible pensar que una alteración en cualquiera de estos tres componentes producirá importantes modificaciones en los otros dos.

D- Relación parénquima/estroma.

La proporción entre los diferentes tipos celulares, así como entre las células y la matriz extracelular (relación parénquima/estroma) es constante para cada tejido (Pérez-Tamayo, 1965). En condiciones fisiológicas, como en el crecimiento del útero durante la preñez (Monfort y Pérez-Tamayo, 1961; Morrione y Seifter, 1962), o en modelos experimentales como en la regeneración hepática después de hepatectomía (Harkness, 1957) o crecimiento compensatorio del riñón después de nefrectomía unilateral (Monfort y Pérez-Tamayo, 1962a), la relación parénquima/estroma puede cambiar inicialmente debido a la activa división celular o a un incremento en el conte-

nido de agua de las células. Sin embargo, después de completado el proceso, se obtiene una relación parénquima/estroma normal.

En condiciones patológicas como por ejemplo en la hipertrófia del corazón, la relación células/matriz, parece mantenerse mientras el peso del órgano sea menor a 500 gr (Monfort y Pérez-Tamayo, 1962b). Si sobrepasa este peso, se presenta fibrosis y se observa un decremento neto en la relación parénquima/estroma. De manera similar, en un estadio final de la cirrosis hepática, el peso del órgano puede disminuir a un tercio de su valor original (500 gr), y el contenido de matriz extracelular aumenta de dos a tres veces (Rojking y Dunn, 1979). Desde un punto de vista fisiopatológico, ésta alteración en la relación es tal vez más importante que el incremento neto de tejido conjuntivo. Lo anterior sugiere un cambio entre las células y un cambio entre las células y la matriz, como ya se estableció anteriormente, esas interacciones son esenciales para el mantenimiento del fenotipo celular normal.

E- Contribución celular a la síntesis de componentes de la matriz extracelular.

La contribución individual de los diferentes elementos celulares del hígado a la biosíntesis y depósito de colágena en condiciones normales y de daño, no ha sido completamente aclarado. A la fecha toda la evidencia presentada en cuanto a la participación de las células parenquimales, células de Ito, fibroblastos y miofibroblastos en la fibrogénesis del hígado se basa en dos métodos indirectos:

- a- Demostración por microscopía electrónica e inmunocitoquímica de un tipo particular de colágena asociada con una célula específica (Kenta y Col., 1976; Oikawa, 1979).
- b- La presencia en varias células de las enzimas involucradas en las modificaciones postraduccionales de la colágena (Guzelian y Diegelman, 1979) y su capacidad para sintetizar diferentes tipos de colágena en cultivo (Rojkind y Dunn, 1979; Foirdart y Col., 1980; Hata y Col., 1980).

Y un método directo:

- c- La incorporación de un precursor radiactivo específico de la colágena, la ³H-Prolina en proteínas colagénicas y no colagénicas (Väänänen y Kulonen, 1984; J. Cerbón-Ambríz y M. Rojkind, datos no publicados).

No se conoce, sin embargo, si las células producen *in vivo* las mismas cantidades y tipos de colágena que secretan *in vitro*. Esta es una importante cuestión por resolver, ya que la globulina insoluble en frío incrementa grandemente la biosíntesis de colágena y fibronectina por una línea celular derivada de hepatocitos en cultivo (Foirdart y Col., 1980). La mayoría de los medios de cultivo usados contienen de 10 a 20 % de suero fetal de bovino, que es una fuente rica de globulina insoluble en frío.

Los datos disponibles indican que las células de Ito pueden producir al menos colágena tipo III (Kent y Col., 1976; Oikawa, 1979) y que los hepatocitos pueden participar en la producción de varios tipos de colágena, fibronectina y laminina (Voss y Col., 1979; Foirdart y Col., 1980; Hata y Col., 1980). Los fibroblastos producen fibronectina (Pearlstein y Col., 1980) y son el tipo celular prototipo que produce colágena y sintetiza simultáneamente las de tipo I y III (Hayne y Col., 1977).

Aunque la presencia de los miofibroblastos en el hígado fue reconocida desde hace varios años (Bhathal, 1972), es sólo recientemente que su papel en la fibrogénesis se ha investigado (Rudolph y Col., 1979; Irle y Col., 1980). El miofibroblasto se asemeja a las células de músculo liso, por analogía, podría producir colágenas tipo I, III y V, la tipo III sería la colágena predominantemente sintetizada por éste tipo celular (Mayne y Col., 1978). Otra importante característica de ésta especie celular es que posee un aparato contráctil que permite la contracción de la célula y del tejido conectivo que la rodea (Irle y Col., 1980). De manera similar a la participación del miofibroblasto en la contracción de la cicatriz del hígado, dando origen a la formación de los llamados "nódulos regenerativos". Esto sugeriría que los nódulos se forman por contracción activa de los miofibroblastos y con ellos el estroma, más que por proliferación de los hepatocitos que quedan atrapados entre gruesas bandas de colágena en la cicatriz.

El origen de los miofibroblastos es desconocido. Podrían derivar del tejido vascular o podrían estar ya presentes en el hígado como precursores latentes. Tal vez algunas células de Ito se pueden transformar en miofibroblastos.

2- La cirrosis hepática.

A- Definición y agentes que la provocan.

La cirrosis hepática es la etapa final común de una serie de padecimientos crónicos y difusos que se caracterizan por necrosis celular, regeneración del parénquima, fibrósis y desorganización de la arquitectura. Dentro de los agentes causantes de la misma se pueden mencionar al alcoholismo, la desnutrición, la hepatitis infecciosa, la obstrucción biliar, algunas enfermedades parasitarias, agentes hepatotóxicos, etc.

B- Fibrogénesis.

a- La matriz extracelular en el hígado cirrótico.

Durante la década pasada, se describieron alteraciones tanto cualitativas como cuantitativas en el tejido conectivo del hígado durante la cirrosis (Rojkind y Martínez-Palomo, 1976; Seyer y Col., 1977) y se encontró que el contenido total de colágena en el órgano aumenta de cuatro a siete veces (Rojkind y Dunn, 1979; Rojkind y Kershenobich, 1981). En los estadios finales de la enfermedad, la colágena tipo I es la que predomina y la relación de colágenas tipo I/tipo III es mayor a 1 (ver Tabla I). Esta es una característica frecuente pero no común en todos los hígados cirróticos humanos o de rata. Se estableció además que los hígados humanos que contenían menos de 20 mg de colágena por gr de tejido fresco presentaban una relación normal de colágenas tipo I/tipo III (1:1) (Rojkind y Col., 1979; Rojkind, 1980).

Algo similar ocurre con animales tratados con tetracloruro de carbono (CCl_4) (Seyer, 1980). El significado de tal incremento en la razón de colágenas tipo I/tipo III no está muy bien comprendido, sin embargo sugiere que mientras las proporciones relativas de colágenas hepáticas se mantengan en sus límites normales, el proceso fibrogénico podrá ser reversible y que cuando la razón de colágena tipo I/colágena tipo III es mayor a 1, el hígado entra en un "estado comprometido" y la fibrogénesis del órgano se llevará a cabo aún cuando el agente etiológico cese y el individuo reciba tratamiento médico (Rojkind, 1980; Rojkind y Kershenobich, 1981).

Como ya se dijo, la relación entre el parénquima y el estroma del hígado cirrótico disminuye debido a un incremento neto en el tejido conjuntivo y la biomatriz que puede ser obtenida de un hígado en éstas condiciones es cuatro veces más abundante que la de un hígado normal (Rojkind y Col., 1983).

Se ha estudiado la distribución de colágenas, fibronectina y laminina en hígados cirróticos mediante el empleo de anticuerpos acoplados a fluoresceína y peroxidasa, la característica más sobresaliente es que se pierde por completo su patrón de arreglo normal y éstos elementos (colágenas y glicoproteínas no colagénicas) se hallan mezclados entre sí formando septos alrededor de cúmulos de hepatocitos (Biempica y Col., 1980; Voss y Col., 1980; Hahn y Col., 1980b; Grimaud y Col., 1980).

b- Depósito de colágena.

Como ya se dijo, los hígados cirróticos de humanos así como de roedores, producen mayores cantidades de colágena que los hígados normales (Rojkind y Dunn, 1979; Rojkind y Kershenobich, 1981), sin embargo la cicatriz formada no puede ser explicada únicamente por ésta sobreproducción de tejido conectivo, además debe tenerse en cuenta el arreglo espacial de la matriz extracelular anormal, lo cual imposibilita la acción degradativa por enzimas colagenolíticas (Pérez-Tamayo, 1979). A ésto se debe agregar que la respuesta del individuo al agente fibrogénico varía ya que depende de su genotipo, de la naturaleza de agente dañino, así como de la intensidad y frecuencia del estímulo (Rojkind y Kershenobich, 1981). Dependiendo de éstos factores el proceso puede seguir dos vías: la regeneración, si el estímulo es único pero de gran intensidad como para destruir gran cantidad de células, o la fibrósis, si el estímulo es pequeño pero sostenido.

Quizá, el problema más importante es que las células depositan colágena en los lugares equivocados, lo cual produce un total desarreglo en la arquitectura del hígado (Rojkind y Pérez-Tamayo, 1983).

c- Las células involucradas.

Como ya se dijo con anterioridad, todas las células del hígado

producen una o más de las macromoléculas de la matriz extracelular en condiciones de cultivo, sin embargo en condiciones de daño hepático, el miofibroblásto tiene mayor importancia por sus características especiales: producen en cultivo los cuatro tipos de colágena presentes en el hígado así como fibronectina (Voss y Col., 1982) y por sus características de célula de músculo liso es posible que también produzca elastina. La presencia de ésta proteína ha sido demostrada en sitios de fibrogénesis activa (Scheuer y Maggi, 1980) y ya ha sido demostrado que células de músculo liso de origen vascular sintetizan elastina (Franzblau y Faris, 1982).

La presencia de miofibroblástos abre la posibilidad de que la apariencia nodular del hígado cirrótico se deba a la contracción de los miofibroblástos llevando consigo fibras de colágena y atrapando cúmulos de hepatocitos. Estas células contienen grandes cantidades de filamentos de actina y algunas sustancias como la serotonina, angiotensina, vasopresina, epinefrina, norepinefrina y prostaglandina $F_{1\alpha}$, son muy activas en inducir la contracción celular (Gabbiani, 1981).

En resumen, se puede concluir de la naturaleza de la cicatriz (aumento en la relación de colágenas tipo I/tipo III) y de la presencia de miofibroblástos, que la cicatriz formada en el hígado cirrótico no es diferente de aquella formada en una herida de la piel, pulmón o algún otro tejido, y que su formación es independiente del agente etiológico que disparó el proceso cicatricial. Esta conclusión está parcialmente apoyada por un estudio llevado a cabo con un número limitado de hígados con diferentes causas de cirrosis (Rojkind y Col., 1979; Rojkind, 1980). En esos pocos casos estudiados, los tipos de colágena y sus proporciones fueron muy similares. Esto es importante porque implica que hay una vía común para la estimulación de la formación de la cicatriz, que es independiente del mecanismo por el cual diferentes agentes químicos y biológicos causan el daño (ver Figura 1) (Rojkind y Pérez-Tamayo, 1983).

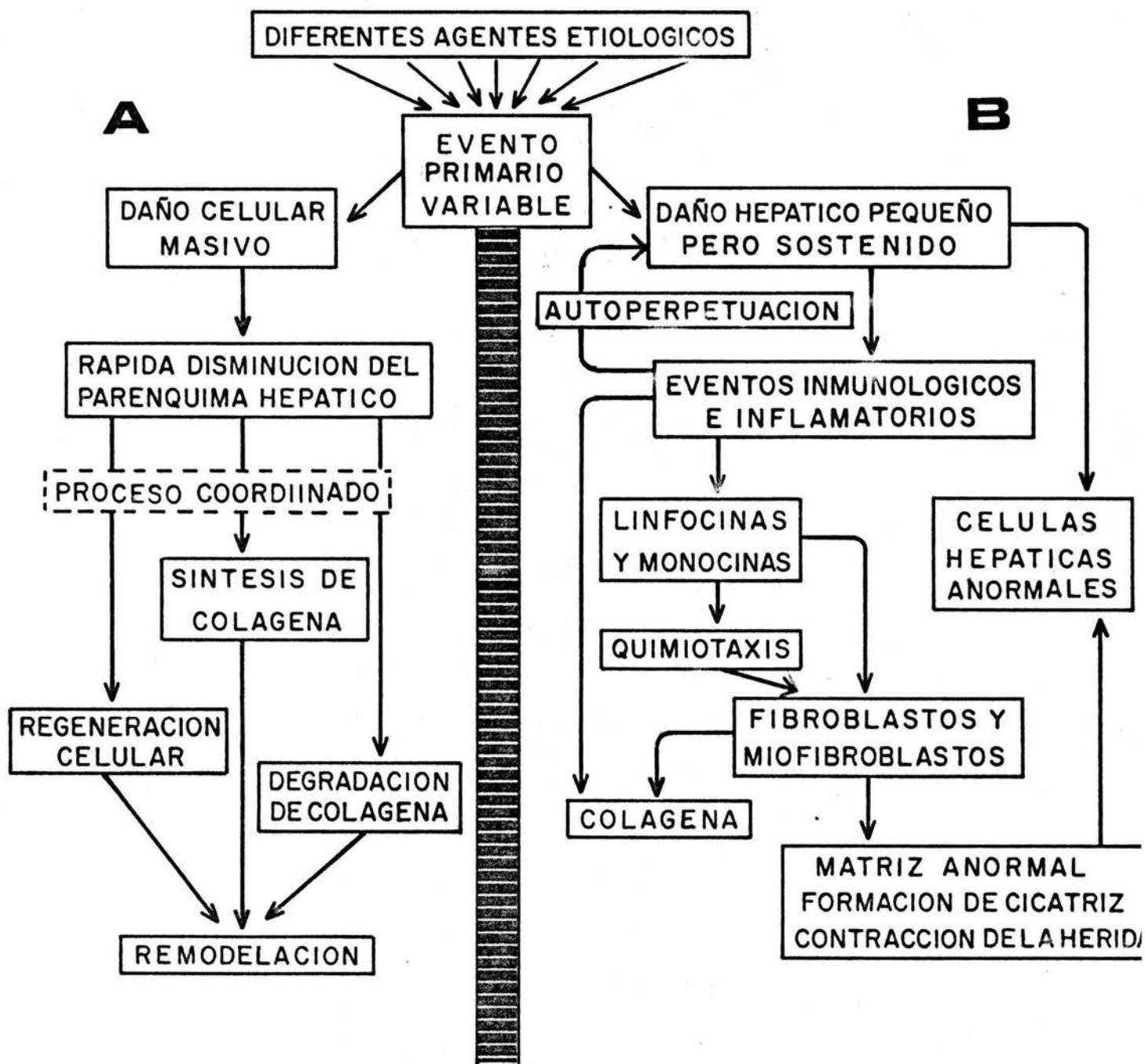


FIGURA 1— REPRESENTACION ESQUEMATICA DE ALGUNOS EVENTOS CELULARES Y METABOLICOS QUE CONECTAN EL DAÑO HEPATICO CON LA REGENERACION CELULAR **A** Y LA FIBROSIS **B***

*— TOMADO DE ROJKIND Y KERSHENOBICH (1981).

d- Mediadores químicos de la fibrogénesis hepática.

Ya se ha mencionado que existe una vía común para la estimulación de la fibrogénesis y que es independiente del agente dañino; a continuación se describen brevemente los pasos, bioquímicamente hablando, que unen la respuesta del hospedero ante el estímulo, ya sea fibrogénico o regenerativo, con la fibrogénesis del tejido.

La descripción de los eventos es muy escueta por la sencilla razón de que existe una gran ignorancia en el área y los mayores avances en la descripción de los mediadores han sido realizados en el campo de la inflamación (ver Wahl y Wahl, 1981). Muchos de los mediadores descritos, con pocas excepciones, han sido identificados en macrófagos peritoneales o pulmonares y en linfocitos circulantes, pero no han sido estudiados en células de Kupffer.

En el hígado normal, los hepatocitos, las células de Kupffer, las demás células sinusoidales y los fibroblastos parecen existir en gran armonía; su proliferación y expresión fenotípica aparentan estar controladas individualmente, pero reguladas por sus células vecinas y por la matriz extracelular en la que se encuentran embebidas; así, el número y tipo de células se mantiene constante por la participación activa de todos los tipos celulares. Es de esperar entonces, que alteraciones específicas en una especie celular se reflejen alterando a los demás tipos celulares.

El daño a las células del hígado se acompaña de la liberación de metabolitos que parecen tener dos efectos generales en la población celular: estimulan la proliferación celular y reclutan otras células que participan en el proceso de reparación tisular.

La liberación de factores que estimulan la proliferación celular ha sido ya demostrada en otras células epiteliales. Cuando hay una herida, las células de la epidermis producen un factor (EGF), que promueve la proliferación celular (Starkey y Col., 1975; Franklyn y Lynch, 1979). Se ha demostrado que este factor, que es diferente al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), estimula la síntesis de DNA en cultivos primarios de hepatocitos de rata (Mc Gowan y Gol., 1981).

Los hígados de ratas parcialmente hepatectomizadas, también

contienen factores capaces de estimular la regeneración del órgano; Labreque y Pesch en 1975 así como Hatase y Col. en 1979, aislaron un componente termoestable y con un peso molecular de entre 10 y 20 Kdal de hígados de rata parcialmente hepatectomizada.

La producción de mediadores que podrían estimular a las células no parenquimales del hígado a participar en el proceso de reparación se ha inferido indirectamente, ya que la mayoría de los estudios han sido realizados con células que no provienen del hígado (Wahl y Wahl, 1981). A pesar de que hay muchas sustancias capaces de producir activación directa de los macrófagos (Stuart y Col., 1979) (y posiblemente también de las células de Kupffer), se obtiene una activación similar de las células de Kupffer con agentes químicos o biológicos que parecen afectar únicamente a las células del hígado (virus de la hepatitis y CCl_4). Es también concebible que los hepatocitos que son afectados por agentes químicos o biológicos sean capaces de liberar mediadores que activen a las células de Kupffer o a otras células del sistema inmune.

Los hepatocitos pueden también producir colagenasa, que es necesaria para remodelar y destruir el exceso de tejido conectivo que permanece después de la destrucción celular y el colapso. Se ha demostrado que los hepatocitos producen colagenasa, pero sólo en cultivos mixtos que contienen células mesenquimales (Maruyama y Col. 1982). El mecanismo de interacción así como la naturaleza de las células que participan, aún se desconoce. Sin embargo, los datos una vez más sugieren que existe una fuerte interacción entre los diferentes elementos celulares de un tejido dado para mantener la homeostasis tisular.

d.1- Activación de las células de Kupffer.

Aunque el nombre de las células de Kupffer ha sido usado en esta sección, la mayor parte de la información que se discutirá proviene de experimentos realizados con macrófagos de diferentes fuentes: peritoneales, pulmonares, etc. Sólo recientemente se ha documentado la producción de factores liberados por las células de Kupffer activadas que estimulan la incorporación de ^3H -Timidina por fibroblastos de piel (Wahl y Col., 1982).

La activación de los macrófagos está acompañada por la producción y liberación de enzimas proteolíticas por esas células. Tales enzimas incluyen colagenasa (Wahl y Col., 1974) y elastasa (Werb y Gordon, 1975); por la secreción de monocinas (Gery y Waksman, 1972) y prostaglandinas (Bray y Col., 1974; Unanue, 1976; Wahl y Col., 1979). La producción de prostaglandinas es independiente de la liberación o producción de monocinas (Wahl y Wahl, 1981). Se han investigado dos tipos principales de monocinas producidas por macrófagos: una, es una proteína de elevado peso molecular, recientemente identificada como fibronectina (Johansson y Col., 1979; Altalero y Col., 1980; Wahl y Col., 1982). Como ya se dijo antes, la fibronectina es un quimioatrayente específico para fibroblastos y no afecta a otras células (Postlethwaite y Col., 1981). La otra monocina que está siendo caracterizada actualmente tiene un peso molecular de entre 40 y 60 Kdal y estimula la proliferación de fibroblastos (Wahl y Wahl, 1981). La presencia de esos dos factores puede explicar per se el incremento en el número de fibroblastos en el hígado cirrótico.

La posible producción de fibronectina por las células de Kupffer sugeriría la posibilidad de un reclutamiento de muchas células, entre ellas a fibroblastos, que producirían directa o indirectamente colágena en los estadios iniciales del proceso de reparación. La fibronectina es capaz de estimular la producción de colágena sintetizada por líneas celulares derivadas de hepatocitos en cultivo y de modificar su expresión fenotípica (Foirdart y Col., 1980). De acuerdo con esto, la liberación de fibronectina en el sitio dañado podría estimular localmente a hepatocitos adyacentes, células de Ito, etc. a producir colágena.

Los aspectos cuantitativos del proceso han sido poco estudiados. Estudios realizados por Crystal y sus colaboradores en 1982, han demostrado que la fibronectina producida por macrófagos alveolares es mil veces más activa que la fibronectina comúnmente presente en la sangre en cuanto a su actividad quimiotáctica para fibroblastos y no sólo eso, sino que los macrófagos activados producen más copias de ésta proteína por unidad de tiempo que los macrófagos no activados.

Este tipo de estudios es más difícil de realizar en el hígado

debido a los problemas intrínsecos para obtener a las células. No obstante, ya se ha reportado que es más fácil obtener cultivos primarios de células endoteliales y miofibroblásticas de explantes de hígados cirróticos de humano que de hígados normales (Voss y Col., 1982). Es importante considerar que la facilidad con que esas células crecen puede ser cuestión del número inicial de células no parenquimales presentes en el tejido o biopsia; por tanto es importante contar con un sistema que permita obtener una muestra considerable de células viables de la población total.

d.2- Activación de los linfocitos.

En algunas circunstancias, aparecen otros tipos de mecanismos que parecen estar involucrados en el proceso fibrogénico. En la esquistosomiasis humana, la fibrosis es estimulada por un mecanismo inmunológico (Warren, 1978). Los huevecillos del esquistosoma liberan antígenos solubles que estimulan la proliferación de fibroblastos (Wyler y Col., 1978). Posiblemente un mecanismo inmunológico similar involucrado con la fibrogénesis del hígado es el que se observa en padecimientos como la cirrosis biliar primaria, en la hepatitis crónica activa y en pacientes con cirrosis alcoholica que desarrollan la enfermedad aún cuando han suspendido su hábito de ingerir alcohol. En éste último caso, los antígenos liberados por los hepatocitos, tales como cuerpos hialinos o lipoproteínas derivadas de membrana, pueden iniciar la respuesta inmune del hospedero (Glyn, 1976; Wands, 1979).

Se ha demostrado que los linfocitos participan tanto en la reacción inflamatoria como en la fibrogénica; producen linfocinas, que estimulan la migración y proliferación de los fibroblastos (Wahl y Col., 1978; Wahl y Wahl, 1981) así como la producción de colágena (Johnson y Ziff, 1976). Estos factores difieren en su peso molecular de las monocinas, pero su actividad farmacológica es similar. Más aún, los linfocitos también liberan un factor activador de macrófagos (MAF).

Las linfocinas y monocinas liberadas por los linfocitos y los macrófagos estimulan la producción de prostaglandinas y cAMP por fibroblastos (Wahl y Wahl, 1981) y ésta última molécula puede ser la señal necesaria para iniciar la biosíntesis de colágena y glicosaminoglicanos.

A pesar de que la descripción del proceso ha sido simplificada, es notoria la complejidad de los eventos que conectan las reacciones inflamatorias y fibrogénicas. Las células pueden ser activadas por mecanismos completamente distintos, incluyendo productos liberados por los hepatocitos dañados. Un importante aspecto en la descripción de los eventos inmunológicos y su relación con la fibrogénesis es la posibilidad de desarrollar agentes químicos con actividad antiinflamatoria o antifibrogénica que inhiban sitios específicos de los ciclos inflamatorios y fibrogénicos, inhibiendo así a estos últimos.

3- Prevención y tratamiento de la fibrosis hepática.

Las posibilidades para prevenir la fibrosis hepática se han incrementado desde el desarrollo de la vacuna contra el virus de la hepatitis B (Szmuness y Col., 1981) y la posibilidad de elaborar una vacuna contra el esquistosoma. No obstante, las probabilidades de prevenir la fibrosis hepática inducida por alcohol son muy pocas, debido en parte a las siguientes razones: los enormes ingresos que significan los impuestos pagados por la venta de licores son un fuerte impedimento para desarrollar programas nacionales para prevenir el alcoholismo y el daño hepático producido por él. La segunda razón es que la inversión de grandes sumas de dinero en todo el mundo destinadas a anuncios comerciales de bebidas alcohólicas ha significado un aumento en el consumo de alcohol, especialmente entre adolescentes. Actualmente se encuentran en desarrollo procedimientos de diagnóstico que sean fácilmente aplicables, confiables y costeables y que puedan ser aplicados a grandes poblaciones, para la detección temprana de la fibrosis hepática (Rojkind, Pérez-Tamayo, Kershenobich y sus respectivos grupos de colaboradores).

Debido a las limitaciones antes mencionadas, durante los pasados diez años, los esfuerzos han sido dirigidos a estudiar el mecanismo de ciertas drogas con actividad antifibrogénica. De la lista de compuestos que han sido usados (Tabla II), la mayoría ha sido probada primeramente en animales de laboratorio y sólo dos han sido aplicadas a humanos con daño hepático con cierto éxito, ellas son la penicilamina y la colchicina. Sin embargo, es importante mencionar que esas dos drogas tienen otras actividades farmacológicas que pueden ser importantes en los resultados generales observados en los pacientes (Rojkind, 1980).

TABLA I F

Mecanismo de acción de drogas antifibróticas*

Droga	Mecanismo de acción
Análogos de prolina (e.g., L-azetidinida-2-carboxilato y cis-hidroxi prolina).	Compiten con la prolina por el transporte y acilación del tRNA. Se incorporan en la colágena en vez de la prolina. Inhiben la prolil-hidroxilación, formación de la tríple hélice y transporte de procolágena. Algunos análogos eliminan fibroblástos en cultivo de tejidos.
Quelantes de hierro.	Inhiben la hidroxilación de residuos de prolina y lisina. No hay glicosilación. Inhiben la formación de hélice y transporte de procolágena.
Latirógenos (e.g., -aminopropionitrilo).	Inhiben a la enzima lisil oxidasa. No hay formación de uniones intra e intermoleculares. La colágena es altamente soluble en soluciones salinas neutras y posiblemente más susceptible al ataque por colagenasas.
Penicilamina.	Se combina con los grupos aldehido libres de la colágena, inhibiendo la formación de uniones intra e intermoleculares. A altas dosis inhibe a la lisil oxidasa.

*Modificado de Rojkind y Dunn (1979).

TABLA II (Continuación)

Mecanismo de acción de drogas antifibrogénicas*

Droga	Mecanismo de acción
Colchicina	Inhibe el ensamble microtubular y el movimiento transcelular de colágena. Induce la producción de colagenasa en el sinovio. Incrementa la liberación de procolagenasa.
Corticosteroides	Efecto antiinflamatorio general. Inhiben la actividad de la prolil-hidroxilasa. Inhiben la síntesis de colágena, pero también inhiben la liberación de proteasas activadoras de procolagenasa.

*Modificado dr Rojkind y Dunn (1979).

II- OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el papel de las células de Kupffer normales en la regulación de la proliferación de fibroblastos bajo condiciones de daño hepático agudo. Así mismo, estudiar el efecto antifibrogénico del fármaco colchicina.

III- MATERIALES Y METODOS.

1- Reactivos y materiales.

El material plástico utilizado en los cultivos (botellas de cultivo, cajas Petri, pipetas, tubos de centrífuga y recipientes), fué adquirido de Lux Scientific Corp. (Newbury Park, Ca. U.S.A.) y de Falcon Labware, Div. Becton Dickerson and Co. (Cockesville, Md. U.S.A.). Las soluciones y medios de cultivo que se utilizaron fueron preparados con reactivos de grado analítico de la más alta pureza: aminoácidos, hormonas, vitaminas y enzimas se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (Phillesburg, N.J. U.S.A.), las diferentes sales, de Merck (Dormastd, R.F.A.). Las mayas de nylon (Pe Cap HD7-85, 166-168 mayas por pulgada) utilizadas en los pasos de filtración de células, se obtuvieron de Tetko Inc. (Elmsford, N.Y. U.S.A.). Los filtros para esterilización de las soluciones de perfusión y de los medios de cultivo fueron de 0.2 μ m y se obtuvieron de Millipore Corp. (Bedford, Ma. U.S.A.). Los precursores radiactivos usados fueron de New England Nuclear Corp.

2- Material biológico.

En todos los experimentos se emplearon ratas machos de la cepa Wistar con un peso aproximado de 180 a 200 gr. Todos los animales recibieron la misma alimentación (Purina) y agua *at libitum*.

3- Diseño experimental.

Los animales fueron divididos en 5 grupos experimentales:

A- Grupo control.

Ratas normales que fungieron como testigos experimentales y que no recibieron tratamiento.

B- Tetracloruro de carbono.

Se provocó la hepatectomía química en un grupo de animales mediante la administración de una dosis aguda de CCl_4 (400 mg/100 gr de peso corporal, diluido 1:1 Vol/Vol en aceite mineral) por vía intragástrica. El análisis del número aproximado de células no parenquimales se realizó a 24, 48 y 72 Hrs después de haber administrado el hepatotóxico.

C- Colchicina - CCl_4 .

Este grupo de ratas recibió una dosis oral diaria (20 μg) de colchicina ((s)-N-(5,6,7,9-tetrahidro-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-benzo (a) heptlen-7-yl) acetamida), durante una semana previo a la persuón del hígado y luego fué tratado con CCl_4 como se describió arriba. El análisis del número de células no parenquimales se llevó a cabo 24, 48 y 72 Hrs después de haber administrado el CCl_4 .

D- Colchicina.

Este lote de ratas recibió únicamente colchicina como se describió ántes. Este grupo tenía por objeto descartar los efectos del fármaco per se.

E- Aceite mineral.

Con el fin de descartar la posible influencia del aceite mineral en la proliferación y/o migración de células en el hígado, un grupo de ratas fué dosificado con 500 μl de aceite mineral 24, 48 o 72 Hrs previo a la perfusión hepática.

4- Aislamiento de las células hepáticas no parenquimales.

Las células hepáticas no parenquimales fueron aisladas como describe Roser (1965) con algunas modificaciones: las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con 1000 U de heparina sódica y anestesiadas con eter. La cavidad peritoneal fué abierta ampliamente sin lesionar el diafragma, el hígado fué canulado con un cateter de vinil y perfundido via vena porta con 100 ml de amortiguador Ringer-Krebs bicarbonato libre de calcio a 37 °C y oxigenado con una mezcla de CO_2 95 % - O_2 5 % con un flujo de aproximadamente 10 ml por min. La vena cava inferior se cortó por debajo de la vena renal con el fin de que la solución amortiguadora fluyera libremente a través de ella, Una vez que el hígado estuvo libre de sangre, se introdujo una cánula de polietileno por la aurícula derecha hacia la vena cava superior, a continuación se procedió a la perfusión enzimática del órgano: 50 ml de amortiguador Ringer-Krebs que contenía 5 mM de CaCl_2 y 0.05 % de Colagenasa bacteriana (Sigma tipo IV) se hicieron circular seguidos de 50 ml del mismo amortiguador conteniendo 0.1 % de Pronasa (Sigma), ésta última solución se recogió

en un recipiente de vinil estéril. Hecho ésto, el órgano se disecó, se escurrió, se pesó y se transfirió al recipiente de vinil. El hígado se cortó en pedazos lo más pequeños posible y se filtró por una malla de nylon, el filtrado se centrifugó a 40 X g por 2 min para eliminar la población de células parenquimales (hepatocitos). Las células no parenquimales remanentes en el sobrenadante fueron colectadas por centrifugación a 150 X g por 5 min y la pastilla fué lavada varias veces con amortiguador Ringer-Krebs bicarbonato que contenía 5 mM de CaCl_2 y 1 % de albúmina sérica bovina. Las células fueron resuspendidas en medio mínimo de Eagle (MEM) suplementado con 10 % de suero fetal de ternera (SFT) previamente inactivado por calentamiento durante 30 min a 56 °C. La viabilidad celular fué determinada por exclusión del colorante azul de tripán (0.3 % en 0.86 % NaCl) y contadas con ayuda de un hematímetro. Las células se sembraron en cajas Petri de vidrio o en botellas Falcon; el medio de cultivo fué cambiado diariamente.

5- Estimación de la recuperación celular.

Debido a que se emplearon diferentes condiciones experimentales, se podía esperar cierta variación en la recuperación de células no parenquimales, por lo tanto se realizaron experimentos con Sulfuro de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tecnecio coloidal, que es captado exclusivamente por células del sistema retículo-endotelial, ésto es, macrófagos séssiles, que se encuentran principalmente en el hígado (células de Kupffer), en el bazo y en la médula ósea (Stern y Col., 1966).

Se siguió el método descrito por Bissell y colaboradores (1972). El sulfuro de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tecnecio coloidal se preparó diariamente en un generador de $^{99\text{m}}\text{Pertechnetato}$ (Cintichem Inc.). Aproximadamente 60 μCi de $^{99\text{m}}\text{Tc-S}$ suspendidos en 500 μl de amortiguador de fosfatos salino fueron inyectados por la vena porta de la rata 15 min ántes de la perfusión del hígado; se aislaron las células no parenquimales como se describió ántes y se contó la radiactividad en ellas, así como en la fracción parenquimal y en el resto del hígado retenido por la malla de nylon. La recuperación de células no parenquimales de cada hígado se calculó comparando la cantidad de emisiones del isótopo en la patilla de células no parenquimales con respecto a la radiactividad del hígado total.

La cuantificación de las emisiones gama del ^{99m}Tc fué realizada en un contador de centelleo Packard modelo 5230 en condiciones previamente establecidas y con una eficiencia mayor al 90 %.

6- Técnicas fagocíticas.

A- Fagocitosis de eritrocitos.

Se empleó la técnica descrita por Bissell y Col. (1972) con algunas modificaciones: aproximadamente 2×10^9 eritrocitos de humano normal fijados con glutaraldehído, suspendidos en amortiguador de fosfatos salino isotónico y calentados 1 Hr a 49°C fueron inyectados por la vena de la cola de la rata 3 Hrs ántes de la perfusión hepática. Las células aisladas como se describió anteriormente que contenían eritrocitos en su interior se identificaron microscópicamente y el número de esas células fué cuantificado y expresado como porcentaje del total de células no parenquimales aisladas.

B- Fagocitosis de carbón coloidal.

Se siguió la técnica que describen Bissell y Col. (1972). Se empleó tinta India (Pelikan Co.), 2 mg/100 gr de peso corporal suspendidos en 500 μl de solución salina isotónica fueron inyectados en la vena porta 15 minutos ántes de la perfusión hepática. Las células no parenquimales aisladas como se describió, y que contenían agregados citoplasmáticos de carbón coloidal fueron identificadas microscópicamente y cuantificadas como se indicó arriba.

C- Peroxidasa endógena.

Con el fin de estimar la proporción de células no parenquimales potencialmente fagocíticas, se realizó una tinción histoquímica para la peroxidasa endógena siguiendo el método descrito por Graham y Karnovsky (1966). Las células no parenquimales del hígado se sembraron en cajas de cultivo con MEM - 10 % SFT durante 1 Hr a 37°C , transcurrido ese tiempo se secaron y se fijaron durante 1 min con 5 % de glutaraldehído en amortiguador de fosfatos salino pH 7.6 a 4°C . Las células se lavaron durante 1 a 3 min a 4°C con la misma solución conteniendo sacarosa al 5 %. Se retiró esta solución y se incubaron 3 Hrs a 37°C con 10 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM,

pH 7.6 conteniendo 0.05 % de 3,3'-Diaminobenzidina y 0.005 % de H_2O_2 . Al cabo de este tiempo, las células se observaron al microscopio, las que presentaron precipitados citoplasmáticos de color café se cuantificaron y su número se expresó como porcentaje de la población total.

7- Obtención del medio condicionado.

El medio condicionado es el medio de cultivo de los macrófagos (tanto células de Kupffer como otros monocitos circulantes) de una rata control o tratada con CCl_4 ; en ese medio se encuentra uno o varios factores solubles liberados por las células que son capaces de estimular o inhibir a los fibroblastos a proliferar (Wahl y Wahl, 1981).

Para la obtención del medio condicionado, se aislaron las células hepáticas no parenquimales como ya se señaló y se sembraron en cajas Petri de vidrio estériles de 60 mm de diámetro con 5 ml de MEM - 10 % SFT durante 1 Hr a 37 °C. El número de células por caja fué de aproximadamente 2×10^6 . Al cabo de este tiempo, se retiró el sobrenadante con las células no adherentes (células endoteliales, células de Ito, eritrocitos, etc.) y la caja se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos salino que contenía glucosa 11 mM. A las células adherentes (células de Kupffer y otros macrófagos) se les agregaron 5 ml de MEM - 1 % SFT y así permanecieron 24 Hrs a 37 °C en una atmósfera de CO_2 95 % - O_2 5 %. Transcurrido ese periodo, el medio de cultivo (medio condicionado) se retiró, se esterilizó por filtración y se almacenó a -20 °C.

8- Cultivo de fibroblastos.

Los fibroblastos (o miofibroblastos) empleados en el presente trabajo se obtuvieron perfundiendo el hígado y aislando las células no parenquimales como ya se describió y poniendo la población heterogénea de células en cajas Petri de vidrio durante 1 Hr con MEM - 10 % SFT a 37 °C. Posteriormente se retiraron las células no adherentes y se colocaron en botellas de cultivo de plástico con MEM - 10 % SFT y así permanecieron varios días. Cada día se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco y se eliminaron las células despegadas. Aproximadamente una semana después únicamente quedaban células con aspecto de fibroblasto, que proliferaron y pronto llegaron a confluencia.

Los ensayos de proliferación de éstos fibroblastos se realizaron con células que se encontraban entre el 5º y el 10º pasajes.

9- Ensayo de proliferación de fibroblastos.

Se sembraron aproximadamente 1.5×10^5 fibroblastos de hígado de rata normal en cajas Petri de plástico de 35 mm de diámetro con 2 ml de MEM - 1 % SFT durante 48 Hrs a 37 °C, al cabo de este tiempo el medio de cultivo fué reemplazado por diferentes concentraciones de medio condicionado (MC): 0, 5, 10 y 20 %; provenientes tanto de ratas control, como de ratas que recibieron una dosis aguda de CCl_4 y 48 Hrs después fueron sacrificadas. Un grupo de cajas de fibroblastos recibió el MC durante 6 Hrs, otro durante 12 Hrs y otro más durante 24 Hrs; transcurridos estos tiempos, las células fueron tripsinizadas, lavadas, contadas con la ayuda de un hematímetro y su viabilidad estimada por exclusión del azul de tripán.

IV- RESULTADOS.

1- Aislamiento de células no parenquimales de hígados normales y tratados con CCl_4 .

La metodología descrita anteriormente y en la que se emplean durante la perfusión del hígado dos enzimas proteolíticas como la colagenasa y la pronasa, rinde una población de células esencialmente libre de eritrocitos y en todos los casos con una contaminación por hepatocitos intactos menor al 1 % (Figura 2). Por el método de exclusión de tripán, se estableció que en todos los casos la viabilidad celular fué mayor al 90 %.

Las fotografías de la Figura 2 muestran una población celular heterogénea en tamaño y forma. Las células más grandes presentan mayor contenido citoplasmático con respecto al núcleo que las células más pequeñas. Estas últimas fueron mucho más abundantes en la población extraída de una rata tratada con CCl_4 , por su tamaño, forma y contenido citoplasmático hacen pensar que algunas de ellas son células sanguíneas (linfocitos, macrófagos, polimorfonucleares) que permanecieron en el sinusoides aún después de lavar el hígado con soluciones fisiológicas y que sólo se liberaron al ser digerido el hígado con soluciones enzimáticas.

Otra diferencia importante entre las dos poblaciones celulares es que algunas horas después de que las células aisladas de un hígado intoxicado con CCl_4 , que fueron sembradas en botellas de cultivo con MEM - 10 % SFT, algunas de ellas se adhirieron a la caja y adquirieron una forma estrellada. La presencia de éste tipo celular fué mucho menos evidente en poblaciones celulares provenientes de ratas control.

Se cuantificó el número total de células hepáticas no parenquimales, tanto de ratas normales ($n=10$ animales), intoxicadas con una dosis aguda de CCl_4 y sacrificadas a diferentes tiempos ($n=4$ animales para cada tiempo), así como de animales que fueron tratados durante una semana con 20 μg diarios de colchicina, intoxicados con una dosis aguda de CCl_4 y sacrificados a diferentes tiempos después de haber recibido el agente hepatotóxico ($n=4$ ratas para cada tiempo). Como control negativo, a un grupo de animales se les administró una

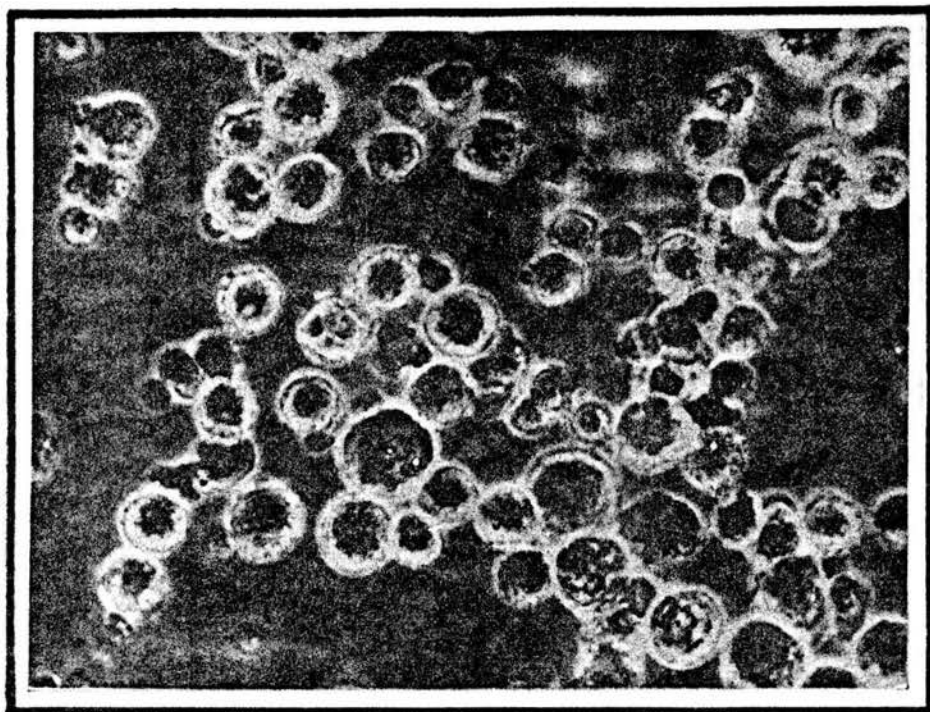
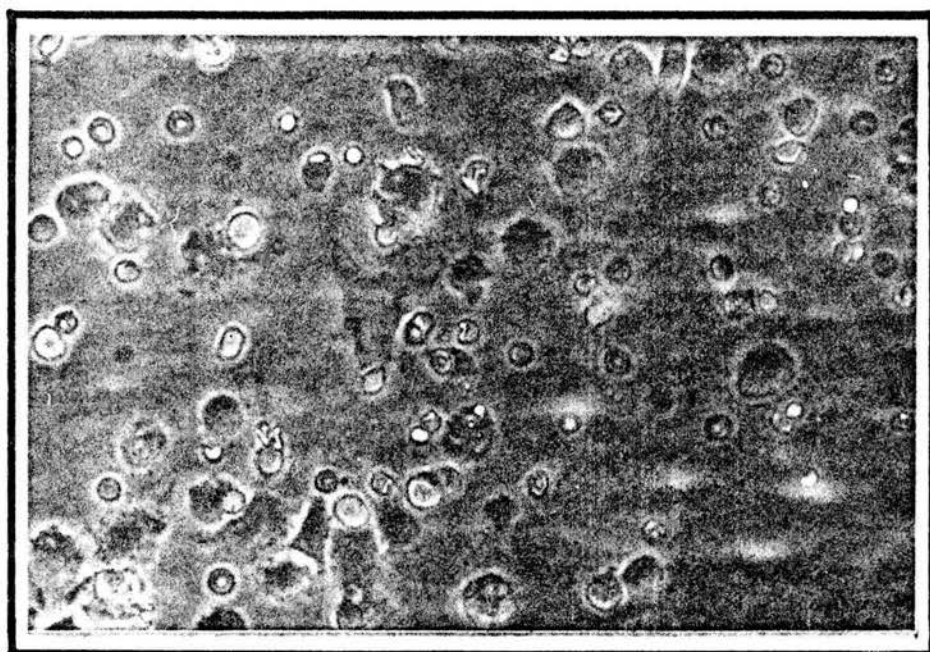
A**B**

FIGURA 2- CELULAS HEPATICAS NO PARENQUIMALES AISLADAS DE UNA RATA NORMAL (A) Y UNA RATA TRATADA CON CCl_4 (B), FOTOGRAFIADAS BAJO EL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASE. 500 X.

dosis única del vehículo (aceite mineral) (n=3 ratas para cada tiempo). Los resultados se muestran en la Figura 3.

La Figura 3 muestra que la administración de CCl_4 produce un incremento en el número de células que es evidente inclusive a las 24 Hrs pues el número de células cuantificadas fué del doble con respecto al control (tiempo cero), éste incremento es más notorio a las 48 Hrs donde el número de células fué seis veces mayor que el control, mientras que a las 72 Hrs fué del triple únicamente.

Así mismo la Figura 3 muestra que el tratamiento previo con 20 ug diarios de colchicina previene en parte el efecto inflamatorio del CCl_4 , pues aunque en todos los casos el número de células fué siempre mayor que el control (1.8 a 2.6 veces), los valores fueron menores que al administrar el CCl_4 solo. Este efecto fué más notorio a las 48 Hrs, cuando el número de células no parenquimales fué aproximadamente 3 veces menor que cuando no se administró la colchicina. Además de la dosis de 20 ug diarios de colchicina se probaron otras dosis mayores (30 y 40 μg), pero los resultados no fueron diferentes a los obtenidos con la dosis de 20 μg (datos no mostrados).

Por otra parte, el aceite mineral por sí solo no mostró tener algún efecto apreciable en el contenido de células sinusoidales hepáticas.

2- Efecto del CCl_4 y la colchicina sobre la actividad fagocítica de las células hepáticas no parenquimales y de las células inflamatorias.

Las células hepáticas sinusoidales (tanto células no parenquimales como células inflamatorias) fueron teñidas para hacer evidente su actividad de peroxidasa endógena (los detalles de la tinción se describen en MATERIALES Y METODOS); lo anterior se hizo con el fin de conocer la proporción de células que son potencialmente fagocíticas bajo diferentes condiciones experimentales. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla III.

La Tabla III muestra que cuando se administra una dosis aguda de CCl_4 48 Hrs previo a la perfusión, aumenta el número de células peroxidasa positivas con respecto al control, así mismo se observa que cuando las ratas reciben un tratamiento de una semana con colchicina previo al CCl_4 , el porcentaje de células con actividad de

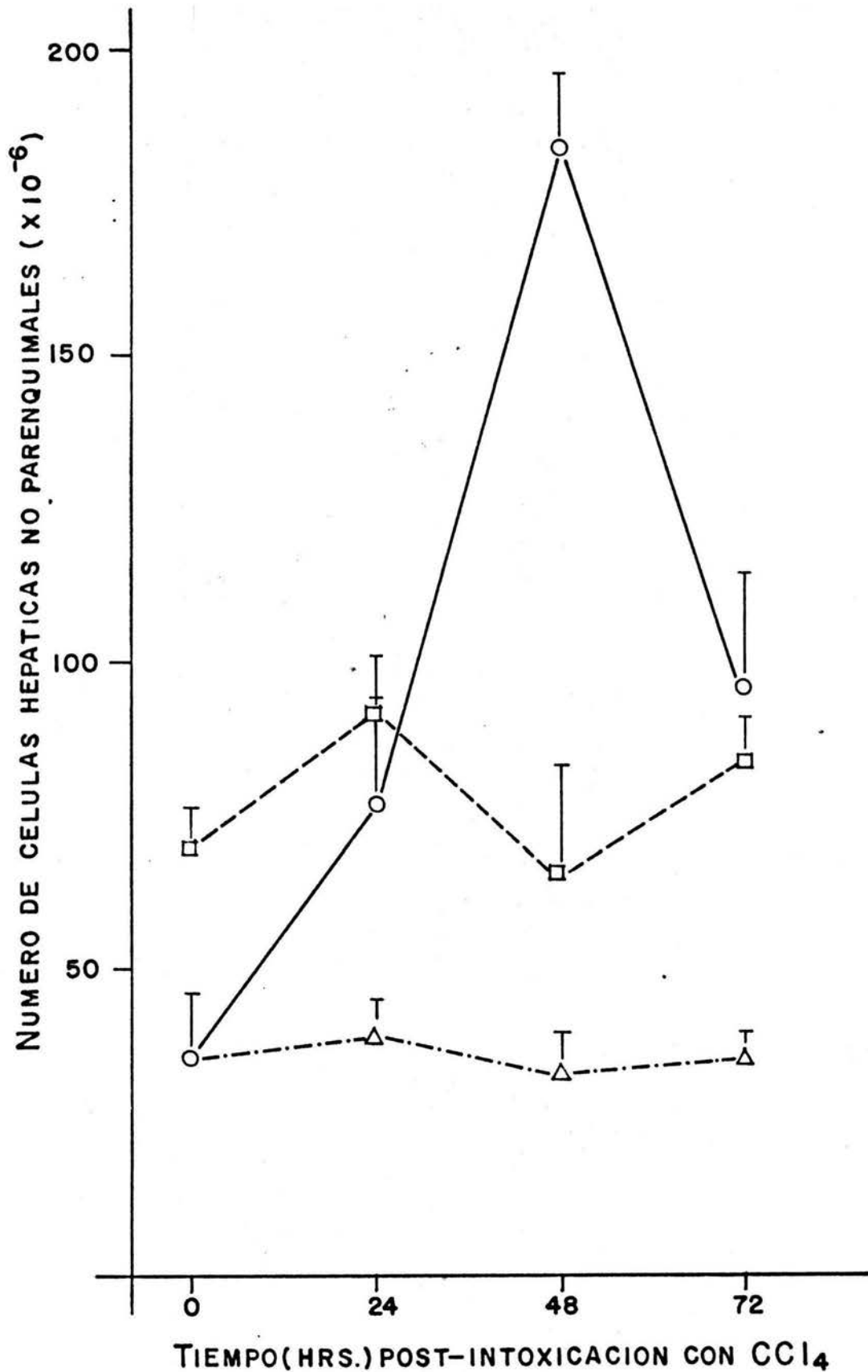


FIGURA 3 - EFECTO DEL CCl₄ Y LA COLCHICINA EN LA POBLACION DE CELULAS NO PARENQUIMALES DEL HIGADO. (o) CCl₄, (□) COLCHICINA + CCl₄, (Δ) ACEITE MINERAL.

TABLA III

PORCENTAJE DE CELULAS POTENCIALMENTE FAGOCITICAS (PEROXIDASA POSITIVAS) Y DE CELULAS FAGOCITANDO (ERITROCITOS Y CARBON COLOIDAL) EN HIGADOS DE RATAS NORMALES, INTOXICADAS CON CCl₄ Y TRATADAS CON COLCHICINA. MEDIA ± DESVIACION ESTANDAR, n= 4.

	PEROXIDASA POSITIVAS	ERITROCITOS Y CARBON COLOIDAL
N O R M A L	35.3 ± 13.8	24.4 ± 4.3
CCl ₄ - 48 HRS.	50.3 ± 4.4	43.2 ± 4.5
COLCHICINA - CCl ₄ - 48 HRS.	36.3 ± 4.8	29.9 ± 6.1
CCl ₄ - 48 HRS. COLCHICINA	47.4 ± 6.2	42.1 ± 6.7

peroxidasa no es diferente del control. Es interesante notar que cuando se administra la colchicina únicamente después del tetracloruro de carbono no se previenen los efectos del hepatotóxico.

En la Figura 4 se muestra un ejemplo de las células teñidas con la técnica de peroxidasa endógena.

En los animales control, las células peroxidasa positivas son razonablemente uniformes en tamaño y forma y corresponden a las células de mayor tamaño que se encuentran en la población de células sinusoidales, se puede pensar que ellas son las células de Kupffer. Por el contrario, las células provenientes de una rata tratada con CCl_4 que dan tinción positiva son mucho más heterogeneas en su tamaño, pues aunque siguen presentandose las células grandes (Kupffer posiblemente), ahora aparecen, y en gran número, células de mucho menor tamaño, que podrían corresponder a macrófagos circulantes así como diversos leucocitos que acuden al sitio de la lesión.

3- Fagocitosis de eritrocitos y carbón coloidal.

La Tabla III también muestra los porcentajes de células sinusoidales que se encuentran fagocitando activamente bajo diferentes condiciones experimentales. Se observa que en los animales control el porcentaje de fagocitosis fluctuó entre 21 y 27 %, mientras que en los animales intoxicados con CCl_4 48 Hrs ántes, los valores fueron de entre 38 y 46 %. Al ser administrada la colchicina, los valores disminuyen hasta 30 % aproximadamente. Cuando se inyectaban los eritrocitos a tiempos menores a 2 Hrs, el porcentaje de células rojas ingeridas era menor en todos los casos y cuando el tiempo excedía de 4 Hrs, la degradación intracelular tenía lugar y la identificación microscópica se hacía más difícil. Sin embargo se estableció que independientemente del intervalo de tiempo empleado, el porcentaje de células sinusoidales aisladas que contenían eritrocitos en su interior era siempre mayor en el caso de que las células provinieran de un animal intoxicado con CCl_4 . Es decir, las células no parenquimales parecen contener una subpoblación de células que es funcionalmente distinguible con respecto a la fagocitosis y que ésta subpoblación incrementa su número al ser estimulada por un agente hepatotóxico.

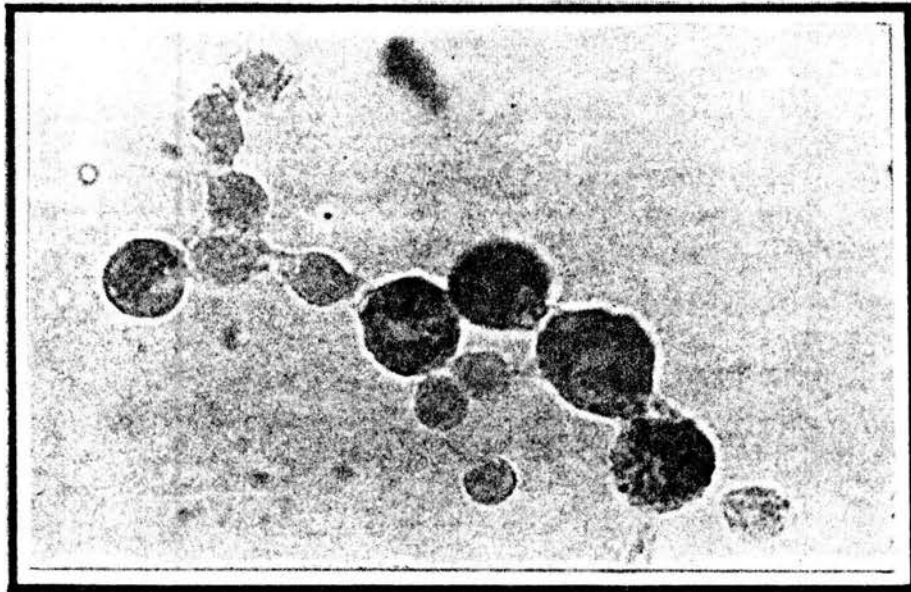


FIGURA 4— CELULAS SINUSOIDALES HEPATICAS AISLADAS POR EL METODO DE COLAGENASA-PRONASA Y TEÑIDAS PARA PEROXIDASA. LAS CELULAS GRANDES Y OBSCURAS SON PEROXIDASA POSITIVAS Y SON FACILMENTE DISTINGUIBLES DE LAS CELULAS PEQUEÑAS NO TEÑIDAS. 600X.

En la Figura 5 se muestra una microfotografía de las células sinusoidales aisladas de una rata contro a la cual se le inyectaron previamente eritrocitos opsonizados y partículas de carbón coloidal como se describe en METODOS.

4- Cuantificación de la fracción celular involucrada en la fagocitosis.

Las observaciones anteriores permiten la estimación de la proporción relativa de células sinusoidales aisladas involucradas en la fagocitosis de partículas y el cálculo del número absoluto de esas células en el hígado total. El uso del $^{99m}\text{Tc-S}$ es conveniente para estimar el porcentaje de recuperación de células fagocíticas del hígado completo (Bissell y Col., 1972).

El porcentaje de células fagocíticas se estimó por medio de la reacción de la peroxidasa endógena. La cantidad relativa de células fagocitando se calculó a partir de la fagocitosis de partículas (eritrocitos y carbón coloidal). En base a esos parámetros, el número absoluto de células fagocíticas y de células fagocitando activamente en el hígado total se calculó como sigue:

(1) Porcentaje de recuperación de células fagocíticas

$$= \frac{\text{cpm } ^{99m}\text{Tc-S en las células aisladas}}{\text{cpm } ^{99m}\text{Tc-S en el hígado total}} \times 100$$

(2) Total de células fagocíticas en el hígado total

$$= \frac{\text{Total de células sinusoidales aisladas} \times \% \text{ de células peroxidasa positivas}}{\% \text{ de recuperación de células fagocíticas}}$$

(3) Total de células fagocitando en el hígado total

$$= \frac{\text{Total de células sinusoidales aisladas} \times \% \text{ de células fagocitando eritrocitos y carbón coloidal}}{\% \text{ de recuperación de células fagocíticas}}$$

Los resultados de una serie de experimentos individuales se

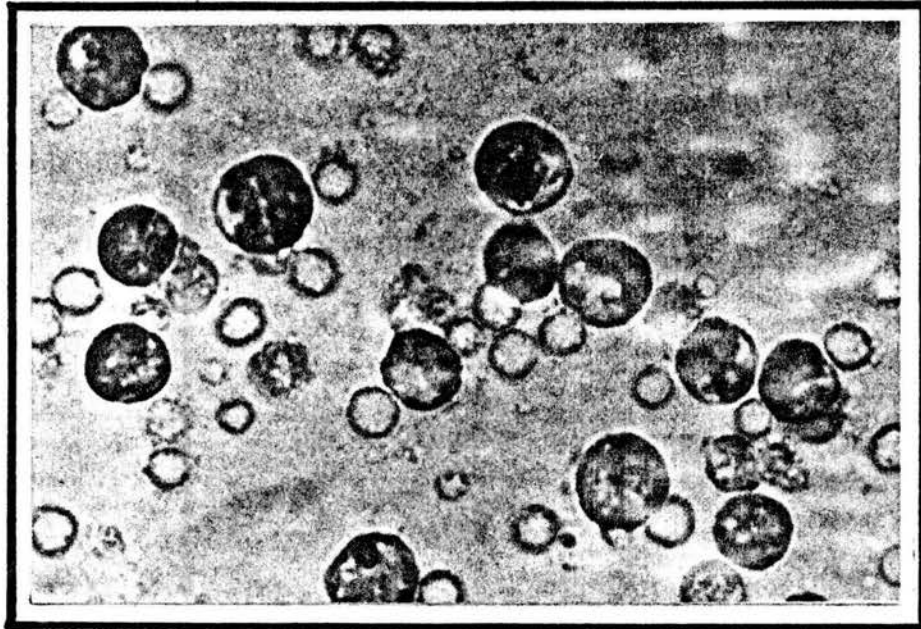


FIGURA 5- CELULAS HEPATICAS SINUSOIDALES AISLADAS POR EL METODO DE COLAGENASA-PRONASA DE UNA RATA CONTROL TRATADA PREVIAMENTE CON PARTICULAS DE CARBON COLOIDAL Y ERITROCITOS OPSONIZADOS. LAS CELULAS MAS GRANDES SE DISTINGUEN POR LA PRESENCIA DE ERITROCITOS Y CARBON COLOIDAL EN SU INTERIOR. LAS CELULAS RESTANTES NO CONTIENEN NI ERITROCITOS NI CARBON COLOIDAL. 500X.

muestran en la Tabla IV. Debido a que el tamaño y peso del hígado no era proporcional al tamaño y peso corporal del animal, los valores se expresan por gramo de hígado.

5- Proliferación de fibroblastos.

Con el fin de conocer la concentración de suero en el medio que un cultivo primario de fibroblastos hepáticos normales requiere para presentar un crecimiento estable o quiescente, se realizaron experimentos en nuestro laboratorio con el fin de conocer las diferentes cinéticas de crecimiento. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 6.

En la Figura 6 se observa que sembrando los fibroblastos a baja densidad (aproximadamente 1×10^5 células/caja de 35 mm de diámetro) y con 1 % de SFT se logran las condiciones deseadas, es decir las células se mantienen vivas pero sin aumentar ni disminuir su número apreciablemente y que 48 Hrs después de haber sembrado las células es el momento adecuado para aplicar un estímulo y observar ya sea aumento o disminución en el número de células.

Teniendo montadas estas condiciones se procedió a probar la influencia de diferentes tiempos de exposición y diferentes concentraciones de medio condicionado proveniente tanto de ratas control como de ratas intoxicadas con CCl_4 sobre la proliferación de fibroblastos hepáticos; los resultados de dos experimentos por triplicado se muestran en la Figura 7.

En la Figura 7 se observa que los fibroblastos en presencia de medio basal (MEM - 1 % SFT únicamente), presentan un crecimiento que podría describirse como estacionario o quiescente, y que al aplicar concentraciones crecientes de medio condicionado control, el número de células disminuye de una manera concentración y tiempo dependiente. Un efecto opuesto se observa al aplicar concentraciones crecientes de MC proveniente de ratas intoxicadas con CCl_4 , el número de fibroblastos aumenta y que éste aumento es proporcional al tiempo de exposición al agente mitógeno presente en el medio condicionado.

TABLA IV

CARACTERIZACION DE LA SUBPOBLACION DE LAS CELULAS HEPATICAS SINUSOIDALES INVOLUCRADAS EN LA FAGOCITOSIS DE PARTICULAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES. LOS VALORES SE EXPRESAN POR 10^6 CELULAS.

	CONTROL MEDIA \pm D.S.	CCl ₄ - 48 MEDIA \pm D.S.	COLCHICINA CCl ₄ - 48 HRS. MEDIA \pm D.S.
TOTAL DE CELULAS SINUSOIDALES AISLADAS.	62 \pm 32	422 \pm 71	143 \pm 64
% DE RECUPERACION DE CELULAS FAGOCITICAS (1).	20 \pm 12	26 \pm 6	20 \pm 4
NUMERO ESTIMADO DE CELULAS SINUSOIDALES.	311 \pm 47	1631 \pm 141	690 \pm 165
TOTAL DE CELULAS FAGOCITICAS EN EL HIGADO TOTAL / gr. DE HIGADO (2).	120 \pm 32	640 \pm 10	230 \pm 81
TOTAL DE CELULAS FAGOCITANDO EN EL HIGADO TOTAL / gr. DE HIGADO (3).	90 \pm 23	570 \pm 10	190 \pm 74

FORMULA (1)

FORMULA (2)

FORMULA (3)

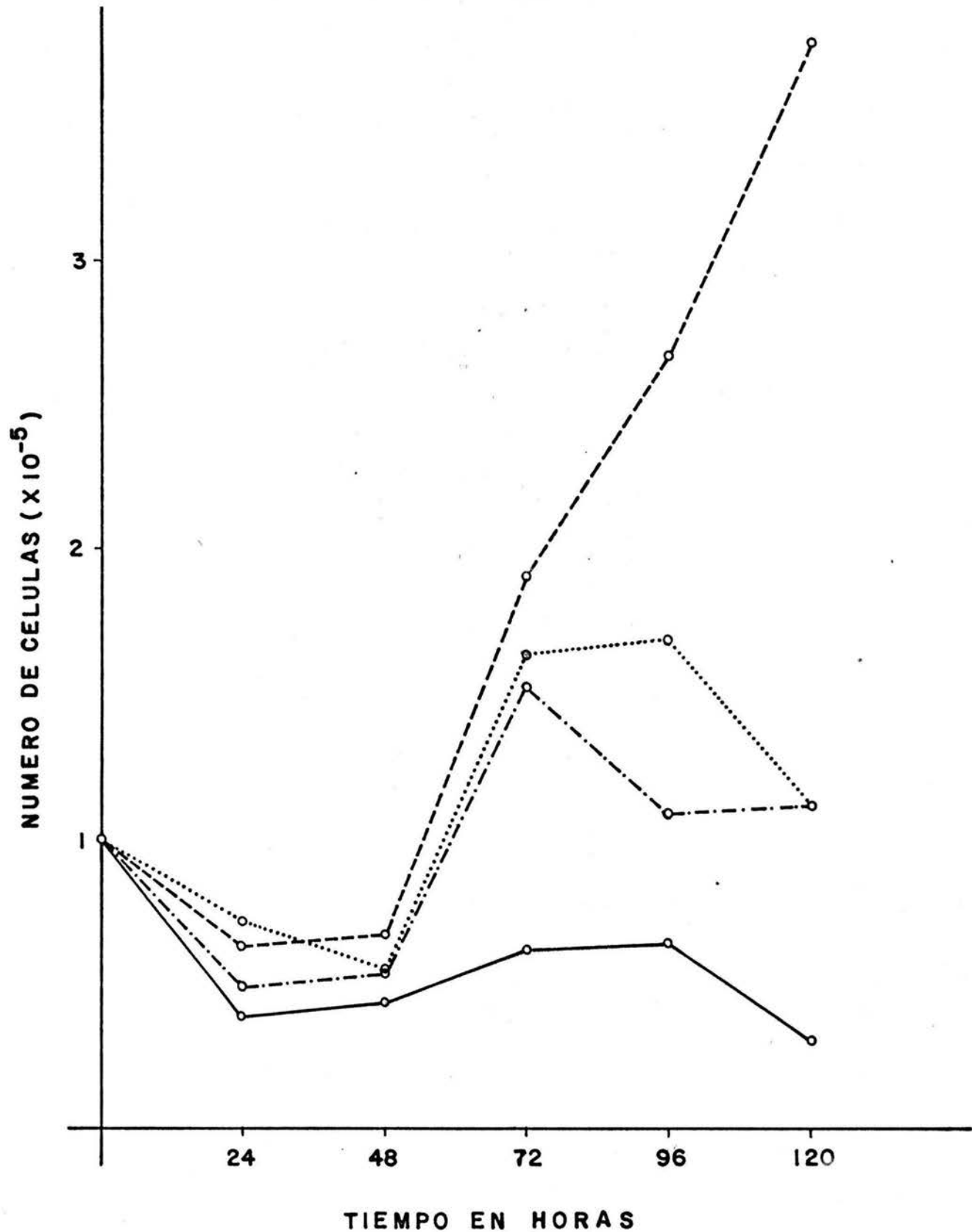


FIGURA 6—PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS HEPATICOS A DIFERENTES TIEMPOS Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUERO.

(—) 1%, (-·-) 3%, (····) 5%, (---) 10%

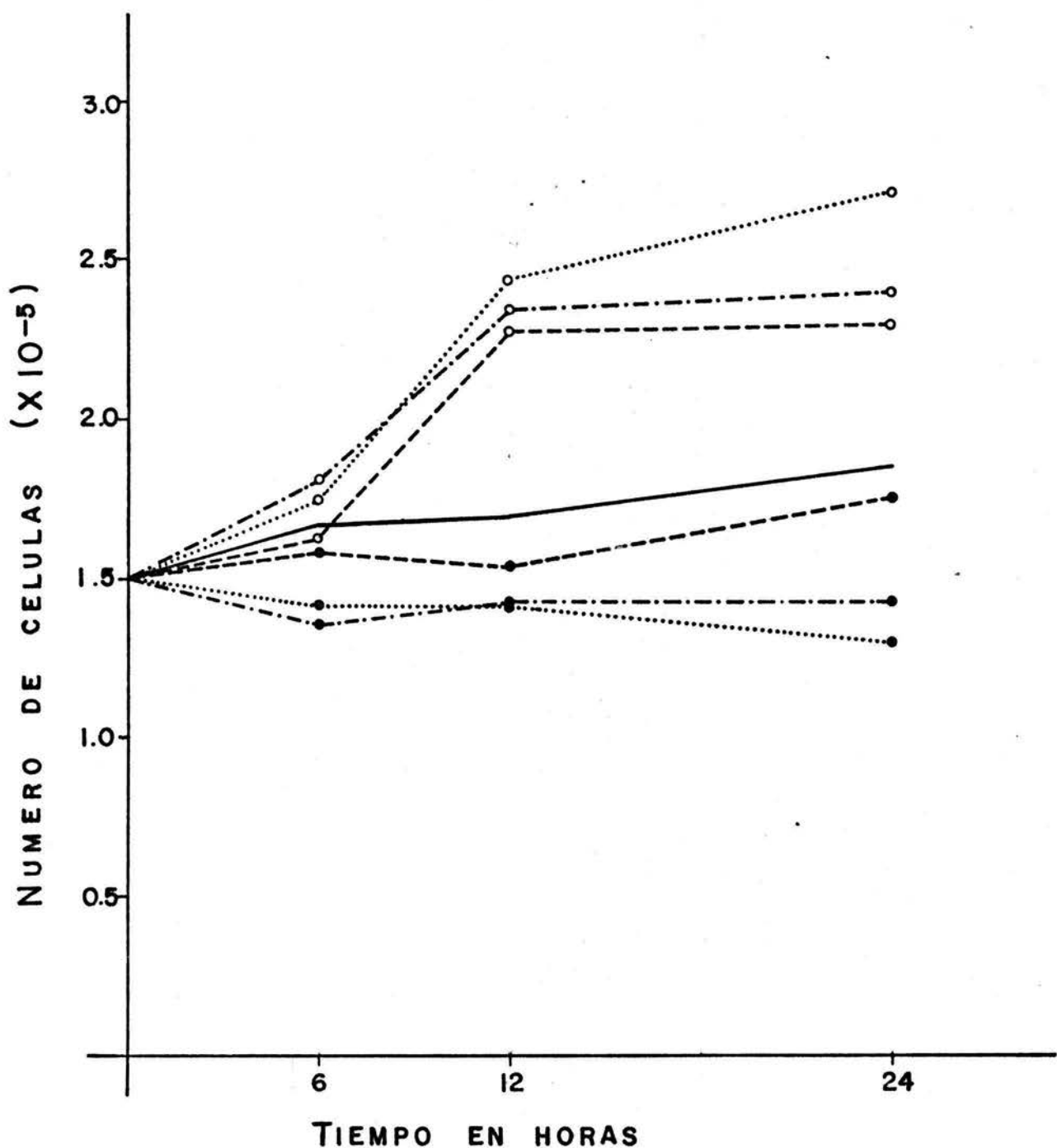


FIGURA 7— INFLUENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MEDIO CONDICIONADO: 0% (—), 5% (---), 10% (- - -) Y 20% (.....) PROVENIENTE DE RATAS NORMALES (•) Y TRATADAS CON CCl₄ (◦) SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS HEPATICOS.

V- DISCUSION.

El correcto funcionamiento de un órgano como el hígado depende de la integridad de los elementos que lo forman. Las especies celulares normalmente presentes en él deben guardar delicadas proporciones entre sí y también con respecto a la matriz extracelular en la que se hallan embebidas. Cuando ocurre un fenómeno que rompe éste delicado balance, la armonía u homeostasis del órgano se pierde y eventos que ántes no tenían lugar, ahora se llevan a cabo (Rojkind y Valadez, 1985). A ésta serie de eventos encaminados a restaurar la homeostasis del órgano se les conoce en conjunto como reacciones inflamatorias o inflamación y aunque muchas de ellas tienen procesos en común, las vías por las que evolucionan son muy variadas, dependiendo en primera instancia del tipo de daño que sufra el tejido, Jackson (1985) clasifica los daños que causan inflamación de la siguiente manera:

- Agentes físicos, tales como calor o frio en exceso, trauma mecánico, radiaciones ultravioleta o ionizantes.
- Agentes químicos, tanto orgánicos como inorgánicos incluyendo toxinas de diferentes bacterias.
- La replicación intracelular de los virus.
- Reacciones de hipersensibilidad como la reacción de los anticuerpos o linfocitos sensibilizados con material antigénico.
- Necrosis de los tejidos, que induce inflamación en los tejidos que lo rodean.

La naturaleza del proceso inflamatorio depende como ya se ha mencionado de otros factores como la o las especies celulares blanco, la intensidad y frecuencia del estímulo patogénico, además de factoes propios del individuo como son su composición genómica, su capacidad de respuesta y su estado metabólico actual (Rojkind y Kershenobich, 1981).

A pesar de la complejidad del proceso inflamatorio, ha sido posible la distinción de dos grandes tipos de inflamación (Solomkin y Simmons, 1983):

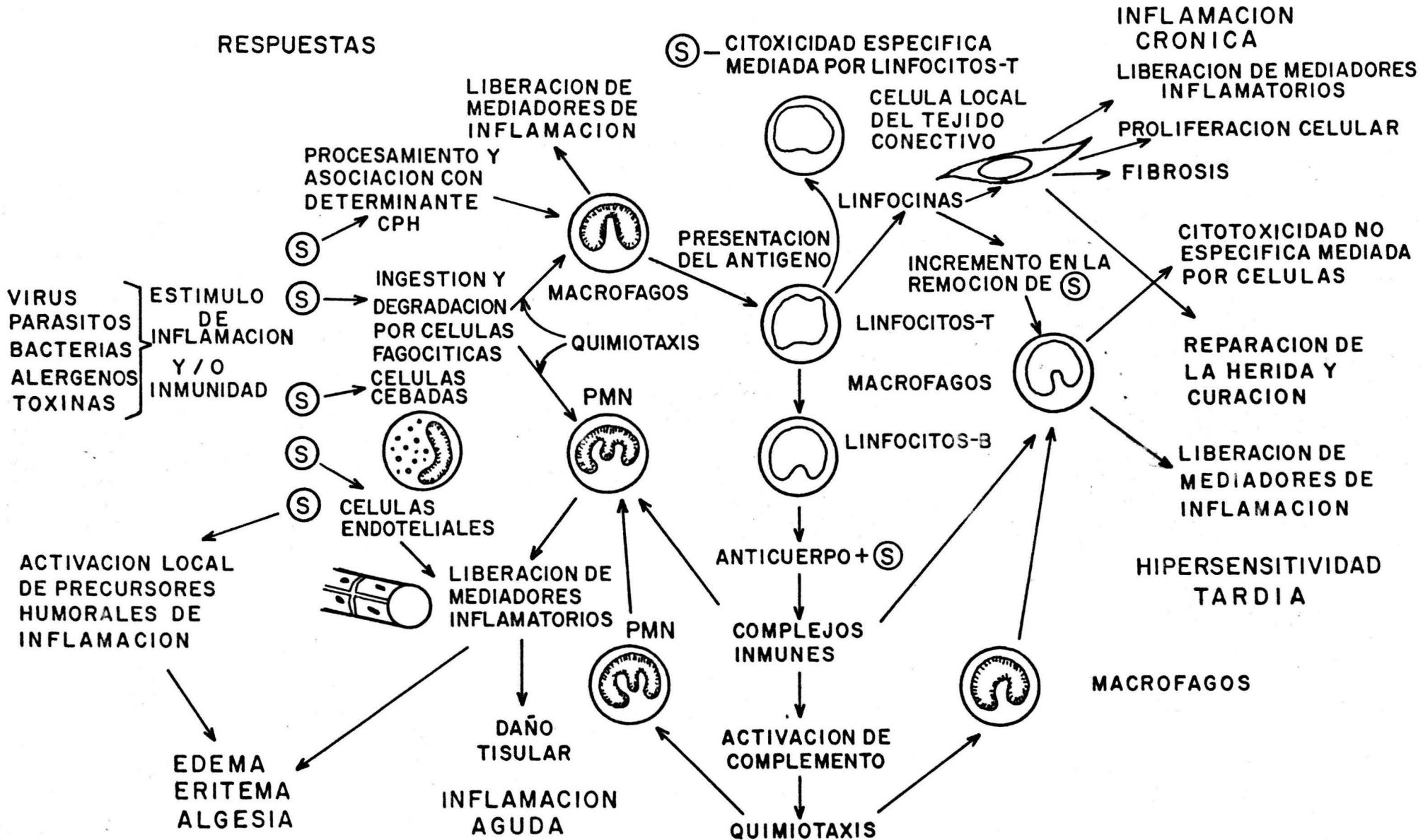
- 1- Cuando se aplica un daño apropiado, capás de producir una necrosis extensiva de un tejido vivo, se desarrolla una reacción de inflamación aguda. Los vasos más pequeños en la vecindad de el tejido dañado se ensanchan y el flujo de sangre que primero es rápido, gradualmente disminuye, un fluido rico en proteínas y en células sanguíneas, tanto eritrocitos como leucocitos escapa de los vasos dilatados a los espacios tisulares. La reacción se debe a cambios en los vasos pequeños y debido a que incluye la salida de constituyentes sanguíneos hacia los tejidos, es comunmente llamada exudativa.
- 2- Un segundo tipo de respuesta inflamatoria a veces llamada inflamación productiva o formativa (para distinguirla de la exudativa), se caracteriza por la proliferación de fibroblástos y la producción de nuevo tejido fibroso. Este tipo de inflamación ocurre particularmente en casos de daño tisular prolongado y está especialmente presente en inflamaciones crónicas.

En algunas instancias, tanto las reacciones exudativas como las formativas son evidentes, pero en lesiones pequeñas pero sostenidas, la formación de tejido fibroso es más prominente. En un principio, el tejido conjuntivo recién formado está altamente vascularizado, es suave y gelatinoso y se le conoce como tejido granulomatoso. Con el tiempo se hace menos vascularizado, progresivamente más colagenoso y gradualmente se convierte en una cicatriz densa y pálida.

Aunque tradicionalmente se ha dividido el proceso inflamatorio en dos grandes grupos: la inflamación aguda o proceso exudativo e inflamación crónica o proceso productivo o formativo, es necesario enfatizar que los dos tipos de reacción a menudo ocurren juntos y a veces simultaneamente.

A pesar de lo anteriormente mencionado, el conocimiento preciso de los eventos celulares y moleculares que caracterizan una respuesta inflamatoria, dista mucho de ser completo. A continuación se esquematizan algunos eventos secuenciales de inflamación y sus respuestas ante la lesión. En ellos se puede observar el papel central que juegan los macrófagos tanto en procesos que tienen que ver con la preservación de la integridad del tejido original como en mecanismos asociados con reparación y restauración del tejido conectivo.

Figura 8- EVENTOS SECUENCIALES MEDIADORES DE RESPUESTAS INFLAMATORIAS Y ENFERMEDAD.



Uno de los primeros eventos que ocurren después del contacto con el estímulo patogénico, es la activación de precursores humorales latentes con la subsecuente formación de quinasas, componentes activados del complemento y productos de coagulación sanguínea (Marceau y Col., 1983; Riches y Stanworth, 1981), que junto con aminas vasoactivas como la serotonina y la histamina y productos derivados de la oxigenación del ácido araquidónico (prostaglandinas) sintetizados por células cebadas, endoteliales y fibroblastos locales, median los síntomas de inflamación aguda: edema, eritema y algesia (Moore y Weiss, 1985). Algunos mediadores, junto con sustancias liberadas por algún estímulo (e.g. productos de la necrosis celular), son quimiotácticos para polimorfonucleares y macrófagos que fagocitan el estímulo (Hopper y Geczy, 1980).

Los procesos de daño inflamatorio agudo ocurren cuando el estímulo patogénico libera mediadores en cantidad suficiente para causar lesión tisular local y destrucción (Muir, 1981).

Cuando el estímulo es persistente e inmunogénico, se activa el sistema inmune. Los macrófagos y otras células presentan el antígeno a los linfocitos T en asociación con productos del complejo principal de histocompatibilidad (Muir, 1981). Las células T y B activadas producen anticuerpos y linfocinas que facilitan la remoción del estímulo por medio de la formación de complejos inmunes, incremento en la fagocitosis y citotoxicidad mediada por células (Howie y McBride, 1982; Robb, 1984). Las linfocinas y productos solubles de los macrófagos también estimulan la reparación tisular y la cicatrización a través de la quimiotaxis a fibroblastos, estimulación de su proliferación e inducción de síntesis de componentes de la matriz extracelular (Wahl y Wahl, 1985).

Si el estímulo es persistente y en grandes cantidades, los sistemas de defensa del hospedero son ineficientes. Eventos subsecuentes conducen a respuestas de hipersensibilidad tardía y daño inflamatorio crónico.

La excesiva producción de complejos inmunes y linfocitos resultan en una proliferación anormal de tejido conectivo y secreción de enzimas que degradan los tejidos por parte de macrófagos, polimorfonucleares y fibroblastos, todo ello conduce a una enfermedad inflamatoria crónica y cicatrización del tejido.

Dentro de éste contexto se enmarcan los resultados obtenidos en el presente trabajo. El incremento en el número en la población de células hepáticas no parenquimales que acompaña al daño celular masivo como el producido por la administración de una dosis aguda de tetracloruro de carbono, es característico de una respuesta inflamatoria aguda, que presenta como principal evento primario la infiltración de células sanguíneas. Por las propiedades fagocíticas de la población celular observada, podemos pensar que se trata de neutrófilos poliformonucleares (PMN) y monocitos macrófagos, que arriban al sitio de la lesión y fagocitan fragmentos celulares necróticos.

El hecho que la colchicina administrada a dosis farmacológicas (20 a 40 ug diarios durante una semana), previniera la llegada de células inflamatorias al sitio de la lesión nos habla del posible modo de acción de éste fármaco.

Hasta ahora se ha pensado que el mecanismo de acción de la colchicina es antifibrogénico y que está dado por su capacidad de unirse a la tubulina, el principal constituyente de los microtúbulos, despolimerizandola y determinando así una disrupción del sistema microtubular (Le Marchand y Col., 1974; Snyder y McIntosh, 1976), de ésta manera se evitaría la exportación de proteínas como la colágena en células que la producen como los fibroblastos. Sin embargo, los microtúbulos cumplen con otras funciones dentro de la célula: son parte del citoesqueleto y son indispensables en la motilidad celular de leucocitos (Caner, 1965; Malawista, 1965; Penny y Col., 1966; Malawista y Bensch, 1967; Popper y Underfiel, 1970; Wallace, 1975; Rinehart y Boulware, 1977), en éstas células se ha observado mediante el uso de colchicina, inhibición de la quimiotáxis (Caner, 1965; Penny y Col., 1966; Rinehart y Boulware, 1977), adherencia (Caner, 1965; Malawista y Bensch, 1967; Rinehart y Boulware, 1977) y degranulación lisosomal (Rinehart y Boulware, 1977). Todo ello determina una resucción de la respuesta inflamatoria.

Además de lo ántes mencionado, la colchicina ha mostrado tener influencia en muchos otros eventos celulares: liberación de pirógeno endógeno por células polimorfonucleares (Bodel, 1976;

evita la secreción de elastasa por macrófagos alveolares (White y Col., 1981); incremento en la producción de prostaglandina F2 en macrófagos peritoneales (Bray y Gordon, 1978); acumulación de cAMP en macrófagos pretratados con PGE1 (Grunspan-Swiesky y Pick, 1978); producción de colagenasa y activador de plaminógeno por macrófagos peritoneales (Gordon y Werb, 1976); inhibición de las siguientes actividades celulares: quimiotáxis de PMN (Caner, 1965; Phelps y McCarty, 1969); adherencia de PMN (Penny y Col., 1966); locomoción de PMN (Ramsey y Harris, 1973); degranulación de PMN (Bodel y Malawista, 1967; Zurier y Col., 1973); fagocitosis de macrófagos (Leher, 1973); respuesta metabólica de macrófagos a ingestión de partículas (Bodel y Malawista, 1967; Leher, 1973); pinocitosis e inducción de enzimas lisosomales por macrófagos (Pesanti y Axline, 1975); liberación de histamina por células cebadas (Gillespie y Col., 1968); citotoxicidad a células tumorales mediada por macrófagos (Martin y Col., 1981); así como la activación de macrófagos inducida por linfocitos (Sharma y Piessens, 1978).

Otras cuatro importantes actividades de la colchicina son: inducción de la producción de colagenasa por el fluido sinovial de enfermos con artritis reumatoidea (Harris y Krane, 1971); incremento en la producción de prostaglandinas (Robinson y Col., 1975); inhibición del movimiento transcelular de colágena en fibroblastos (Diegelman y Peterkovsky, 1972; Ehrlich y Bornstein, 1972) y finalmente, disminución de la actividad basal del sistema adenilato ciclasa en ratas tratadas con CCl_4 (Mourelle y Col., 1981).

De lo anterior podemos deducir que el espectro de acción de la colchicina es muy amplio y que su actividad va a depender de la etapa del proceso en que se use, la concentración efectiva que se emplee y el tipo celular al que se dirija. Debido a que algunos pasos del proceso de inflamación y reparación tisular no se ven afectados por la colchicina, es necesario contar con otro tipo de fármacos antiinflamatorios con diferente espectro de acción y ello sólo es posible en la medida que se conozca con detalle el proceso de respuesta inflamatoria, sus causas, los elementos celulares y moleculares que participan en él, las vías alternas de acción, etc.

Desde hace algunos años se reconoce la importancia que juegan

mediadores del tipo de las prostaglandinas en los eventos de daño tisular (Zeitlin, 1981), por ello se ha encontrado que modulando su síntesis por medio de esteroides como la dexametasona y de drogas no esteroidales como la indometacina, es posible controlar la sobreproducción de mediadores proinflamatorios y así detener el proceso de destrucción celular y fibrosis (Wahl y Wahl, 1985).

En el presente trabajo también se evaluó el papel de una nueva droga llamada Silimarina en la prevención de daño hepático causado por el CCl_4 . Los resultados aunque preliminares, indican que su modo de acción es similar al de la colchicina, pues administrada durante una semana previo a la intoxicación con CCl_4 , y en dosis farmacológicas, previno la llegada de células inflamatorias al sitio de la lesión de una manera similar a la colchicina. En nuestro laboratorio se continúa trabajando con ésta droga para conocer más a fondo su blanco de acción y saber si posee efectos colaterales indeseables.

La influencia de factores solubles secretados por células inflamatorias sobre la proliferación de fibroblastos en cultivo ha sido estudiada por diferentes autores en sistemas no hepáticos (Clark y Col., 1980, 1982 y 1983; Renard y Col., 1981; Wahl y Wahl, 1981; Wahl y Gately, 1983; Wahl y Wahl, 1985), sin embargo, ésta es la primera vez que se estudia en un sistema hepático y a la vez se comparan condiciones normales con aquellas que se presentan después de un daño celular hepático masivo. La diferencia observada entre el efecto producido por las dos distintas poblaciones celulares se puede interpretar en el sentido de que la población adherente normalmente presente en el hígado (células de Kupffer), libera al medio uno o más factores que limitan e incluso inhiben la proliferación de fibroblastos hepáticos y los mantienen en un estado latente, mientras que la población de células adherentes que se halla presente en el hígado en respuesta al daño causado por el CCl_4 o a algún evento que se desprende de él, no sólo no inhibe la proliferación de los fibroblastos, sino que la estimula en una forma tiempo y concentración dependiente, llegando a valores máximos de estimulación de 46 % con respecto al medio basal (MEM - 1% SFT).

Lo anterior sugiere que el estímulo patogénico o algún pro-

ducto derivado de la necrosis celular promueve la liberación de uno o más factores por parte de la población de células inflamatorias que es diferente en su acción sobre el ciclo celular del fibroblásto hepático que aquel o aquellos que se liberan normalmente por las células de Kupffer.

Clark y Col., (1983) reportan la presencia de un factor soluble liberado por macrófagos alveolares y células inflamatorias presentes en el pulmón después de aplicar una dosis aguda de Bleomicina. Dicho factor inhibe la proliferación y síntesis de colágena de fibroblástos pulmonares en cultivo, dicho factor es dependiente de la síntesis de prostaglandinas. La aparente discrepancia de los datos reportados por el grupo de Clark con los presentados aquí puede ser debida al tiempo que transcurre desde la aplicación del agente tóxico (Bleomicina o CCl_4) a la extracción de las células productoras del agente mitógeno, pues mientras los resultados aquí presentados dan evidencia de las primeras etapas del proceso inflamatorio (48 Hrs), los presentados por Clark y su grupo dan prueba de la actividad del macrófago en las etapas finales del proceso de inflamación aguda (2 semanas).

VI- REFERENCIAS.

- Akasaki, M., T. Kawasaki y I. Yamashina (1975) *FEBS Lett.* 59, 100-104.
- Alitalo, K., T. Hovi y A. Vaheri (1980). *J. Exp. Med.* 151, 602-613.
- Bhathal, P. S. (1972). *Pathol. Annu.* 4, 139-144.
- Biempica, L., R. Morecki, C. H. Wu, M. A. Giambrone y M. Rojkind. (1980). *Am. J. Pathol.* 98, 591-620.
- Birdwell, C. R., D. Gospodarowicz y G. L. Nicolson. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3273-3277.
- Bissell, D. M., L. Hammaker y R. Schmid. (1972). *J. Cell. Biol.* 54, 107-119.
- Blumenstock, F. A., T. M. Saba, P. M. Weber y R. Laffin. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4287-4291.
- Bodel, P. (1976). *J. Exp. Med.* 143, 1015-1023.
- Bodel, P. y S. Malawista (1967) *J. Invest.* 46, 786-795.
- Bray, M. A. y D. Gordon (1978) *Br. J. Pharmacol.* 63, 635-641.
- Bray, M. A., D. Gordon y J. Morley (1974) *Br. J. Pharmacol.* 52, 453-459.
- Bronfenmejer, S., F. Schaffner y H. Popper (1966) *Arch. Pathol.* 82, 447-453.
- Caner, J. E. A. (1965) *Arthritis Rheum.* 8, 757-768.
- Carlsson, R., E. Engvall, A. Freeman y E. Ruoslahti (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 2403-2406.
- Clark, J. G., B. C. Starcher y J. Uitto (1980) *Biochem. Biophys. Acta.* 631, 359-370.
- Clark, J. G., K. M. Kostal y B. A. Marino (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8098-8105.
- Clark, J. G., K. M. Kostal y B. A. Marino (1983) *J. Clin. Invest.* 72, 2082-2091.
- Crystal, R. G., O. Kawanami S. I. Rennard, J. E. Cadek, C. I. Schoenberg y P. B. Bitterman (1982) *J. UOEH.* 4, 85-94.

- Daoust, R. (1958) En: "Liver function" (R. W. BRAVER, Ed.), p. 3. Am. Inst. Biol. Sci. Washington, D. C.
- Diegelman, R. F. y B. Peterkovsky (1972) *Dev. Biol.* 28, 443-453.
- Dietrich, C. P., L. O. Sampaio y O. M. S. Toledo (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 1-10.
- Ehrich, H. P. y P. Bornstein (1972) *Nature (London)* 238, 257-260.
- Fahimi, H. D. (1970) *J. Cell. Biol.* 47, 247-262.
- Federgreen, W. y K. S. Stenn (1980) *J. Invest. Dermatol.* 75, 261-263.
- Foirdart, J. M., J. J. Berman, L. Paglia, S. I. Rennard. S. Abe, A. Parantoni y G. R. Martin (1980) *Lab. Invest.* 42, 525-532.
- Franklyn, I. D. y J. B. Lynch (1979) *Plat. Reconstr. Surg.* 64, 766-770.
- Franzblau, C. y B. Faris (1982) En: "Methods in Enzymology" (L. W. Cunningham y D. W. Frederiksen, Eds.), Vol. 82. Parte A. pp. 615-637. Academic Press, New York.
- Gabbiani, C., G. B. Ryan y G. Majno (1971) *Experientia* 27, 549-550.
- Gabbiani, G., M. Le Lous, A. J. Bailey, S. Bazin y A. Delaunax (1976) *Virchows Archiv. B.* 21, 133-145.
- Gabbiani, C. (1981) *Prog. Clin. Biol. Res.* 54, 183-194.
- Gale, R. P., R. S. Sparkes y D. W. Golde (1978) *Science* 201, 937-938.
- Gates, G. A., K. S. Henley, H. M. Pollard, E. Schmidt y F. W. Schmidt (1961) *J. Lab. Clin. Med.* 57, 182-184.
- Gery, I. y B. W. Waksman (1972) *J. Exp. Med.* 136, 143-155.
- Gillespie, E., P. J. Levine y S. E. Malawista (1968) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 164, 158-167.
- Glyn, L. E. (1976) *Prog. Liver Dis.* 5, 311- 325.
- Gordon, S. y Z. Werb (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 872-876.

- Graham, R. C. y M. J. Karnovsky (1966) *J. Histochem. Cytochem.* 14, 291-300.
- Grimaud, J. A., M. Druguet, S. Peyrol, O. Chevalier, D. Herbage y N. El Badrawy (1980) *J. Histochem.* 28, 1145-1156.
- Grinnell, F. y M. H. Bennett (1981) *J. Cell. Sci.* 48, 19-34.
- Grisham, J. W., W. Neopanitaya y J. Compagne (1976) *Prog. Liver Dis.* 5, 1-23.
- Gudewicz, P. W., J. Molnar, M. Z. Lai, D. W. Beezhold, G. F. Siefring, R. B. Credo y L. Lorand (1980) *J. Cell Biol.* 87, 423-427.
- Gruspan-Swiesky, A. y B. Pick (1978) *Immunopharmacol.* 1, 71-78.
- Guzelian, P. S. y R. F. Diegelman (1979) *Exp. Cell. Res.* 123, 269-279.
- Guzelian, P. S., R. F. Diegelman, G. D. Qureshi, R. Gay y S. Gay (1980) *Gastroenterology* 79, 1024-1035.
- Hahn, E. G., G. Wick, D. Pancev y R. Timpl (1980) *Gut* 21, 63-71.
- Harkness, R. D. (1957) *Br. Med. Bull.* 13, 87-93.
- Harris, E. D. y S. M. Krane (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 258, 566-572.
- Hata, R., Y. Ninomiya, Y. Nagai y Y. Tsukada (1980) *Biochemistry* 19, 169-176.
- Hatase, O., T. Fujii, M. Kuramitsu, T. Itamo, F. Takahashi, T. Murakami y T. Nisida (1979) *Acta Med. Okayama* 33, 73-80.
- Hayne, R., M. S. Vail y E. J. Miller (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 181, 462-469.
- Hopper, K. E. y C. L. Geczy (1980) *Cell. Immunol.* 56, 400-414.
- Howie, S. y W. H. Mc Bride (1982) *Immunol. Today* 3, 273-277.
- Irle, C., O. Kocher y G. Gabbiani (1980) *J. Submicrosc. Cytol.* 12, 209-217.
- Ito, T. y M. Nemoto (1952) *Folia Anat. Jpn.* 24, 243-258.
- Ito, T. y S. Shibasaki (1968) *Arch. Histol. Jpn.* 29, 137-192.

- Jackson, E. M. (1984) *J. Toxicol.-Cut. & Ocular Toxicol.* 3, 347-356.
- Jaffe, F. A. y D. F. Mosher (1978) *J. Exp. Med.* 147, 1779-1791.
- Johansson, S., K. Rubin, M. Høök, T. Ahlgren y R. Seljelid (1979) *FEBS Lett.* 105, 313-316.
- Johnson, R. L. y M. Ziff (1976) *J. Clin. Invest.* 58, 240-252.
- Kent, G., S. Gay, T. Inoyue, R. Bahu, O. T. Mick y H. Popper (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3719-3722.
- Kjellén, L., I. Pettersson y M. Høök (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 5371-5375.
- Kleinman, H. K., R. J. Klebe y G. R. Martin (1981) *J. Cell. Biol.* 88, 473-485.
- Koizumi, T., N. Nakamura y H. Abe (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 148, 749-756.
- Kumagai, K., K. Itoh, S. Hinuma y M. Tad (1979) *J. Immunol. Methods* 29, 17-25.
- Kurkinen, M. y K. Alitalo (1979) *FEBS Lett.* 102, 64-68.
- Labreque, D. R. y L. A. Pesch (1975) *J. Physiol. (London)* 248, 273-284.
- Leher, R. L. (1973) *J. Infect. Dis.* 127, 40-50.
- Le Marchand, Y., C. H. Patzelt, F. Assimakopoulos-Jeannet (1974) *J. Clin. Invest.* 53, 1512-1520.
- Lloyd, K. O., L. R. Travassos, T. Takahashi y L. J. Old (1979) *J. Natl. Cancer Inst.* 63, 623-633.
- Macarak, E. J., E. Kirby, T. Kirk y N. A. Kefalides (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2621-2625.
- Mc Gee, J. O. D. y R. S. Patrick (1972) *Lab. Invest.* 26, 429-440.
- Mc Gowan, J. A., A. J. Strain y N. L. R. Bucher (1981) *J. Cell. Physiol.* 108, 353-363.
- Majno, G. (1979) *Am. J. Surg. Pathol.* 3, 535-554.

- Majno, G., G. Gabbiani, B. J. Hirschel, G. B. Ryan y P. R. Statkov (1971) *Science* 173, 548-550.
- Malawista, S. (1965) *J. Exp. Med.* 122, 361-384.
- Malawista, S. y V. G. Bensch (1967) *Science* 156, 54-57.
- Marceau, F., A. Lussier, D. Regoli y J. P. Giroud (1983) *Gen. Pharm.* 14, 209-229.
- Martin, F., N. O. Olsson y J. F. Jeannin (1981) *Cancer Immunol. Immunother.* 10, 113-122.
- Maruyama, K., I. Okasaki, T. Kobayashi y H. Suzuki (1982) *J. UOEH* 4, 183-186.
- Mayne, R., M. S. Vail y E. J. Miller (1978) *Biochemistry* 17, 446-452.
- Miyai, K. (1979) En: "*Toxic Injury in the Liver*" (E. Farber y M. M. Sishere, Eds.), Parte A, pp 59-154. Dekker, New York.
- Monfort, I., y R. Pérez-Tamayo (1961) *Lab. Invest.* 10, 1240-1258.
- Monfort, I., y R. Pérez-Tamayo (1962a) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 110, 731-734.
- Monfort, I., y R. Pérez-Tamayo (1962b) *Lab. Invest.* 11, 463-470.
- Moore, T. L. y T. D. Weiss (1985) *Sem. Arthritis & Rheum.* 14, 247-262.
- Morrione, T., y S. Seifter (1962) *J. Exp. Med.* 115, 357-365.
- Motta, P. y K. R. Porter (1974) *Cell Tissue Res.* 148, 111-125.
- Mourelle, M., M. Rojkind y B. Rubalcava (1981) *Toxicology* 21, 213-222.
- Muir, M. (1981) *J. Immunol.* 147, 678-693.
- Murray, B. A., R. Ansbacher y L. A. Culp (1980) *J. Cell. Physiol.* 104, 335-348.
- Nakane, P. (1963) *Anat. Rec.* 145, 265-266.
- Ninomiya, Y., R. I. Hata y Y. Nagai (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 349-358.
- Ninomiya, Y., R. I. Hata y Y. Nagai (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 675, 248-255.

- Oikawa, K. (1979) *Tohoku J. Exp. Med.* 129, 373-387.
- Oldberg, Å., L. Kjellén y M. Høkk (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8505-8510.
- Pearlstein, E., L. I. Gold y A. García-Pardo (1980) *Mol. Cell. Biochem.* 29, 103-128.
- Penny, R., D. A. G. Galton y J. Smith (1966) *Br. J. Haematol.* 12, 623-631.
- Pennypacker, J. P. (1981) *Vision Res.* 21, 65-69.
- Pennypacker, J. P., J. R. Hassell, K. M. Yamada y R. M. Pratt (1979) *Exp. Cell. Res.* 121, 411-415.
- Pérez-Tamayo, R. (1965) *Prog. Liver Dis.* 2, 192-210.
- Pérez-Tamayo, R. (1979) *Pathol. Annu.* 14 (Vol. 2), 183-213.
- Pesanti, E. L., y S. G. Axline (1975) *J. Exp. Med.* 141, 1030-1038.
- Phelps, P. y A. J. Mc Carty (1969) *Postgrad. Med.* 45, 87-94.
- Ponce, P., J. Cordero y M. Rojkind (1981) *Hepatology* 1, 204-210.
- Popper, H. y S. Underfiel (1970) *Am. J. Med.* 49, 707-721.
- Postlethwaite, A. E. Kesi-Oja, J., G. Balian y A. H. Kang (1981) *J. Exp. Med.* 153, 494-499.
- Prinz, R., V. Klein, P. R. Sudhakaran, W. Sinn, K. Ullrich y K. von Figura (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 630, 402-413.
- Ramsey, W. B. y A. Harris (1973) *Exp. Cell. Res.* 82, 262-270.
- Rennard, S. I., G. W. Hunninghake, P. B. Bitterman y R. G. Crystal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7147-7151. (1981).
- Rhodin, J. A. G. (1965) *Reticuloendothel. Syst.: Morphol., Immunol. Regul., Proc. Int. Symp.*, 4th. p. 108.
- Riches, D. W. H. y D. R. Stanworth (1981) *Immunology* 44, 29-39.
- Rinehart, J. J. y T. Boulware (1977) *J. Lab. Clin. Med.* 90, 737-745.
- Robb, R. J. (1984) *Immunology Today* 5, 203-209.
- Robinson, D. R., H. Smith, M. B. McGuire (1975) *Prostaglandins* 10, 67-73.

- Rohr, H. P., J. Luthy, F. Gudat, M. Oberholtzer, C. Gysin, G. Stalder y L. Bianchi (1976) *Prog. Liver Dis.* 5, 24-34.
- Rojkind, M. (1980) *Ital. J. Gastroenterol.* 12, 97-103.
- Rojkind, M. y M. A. Dunn (1979) *Gastroenterology* 76, 849-863.
- Rojkind, M. y D. Kershenobich (1981) *Clin. Gastroenterol.* 10, 737-754.
- Rojkind, M. y A. Martínez-Palomo (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 539-543.
- Rojkind, M. y P. Ponce-Noyola (1982) *Collagen Rel. Res.* 2, 151-175.
- Rojkind, M. y R. Pérez-Tamayo (1983) En "*International Review of connective Tissue Research: Liver Fibrosis*" (D. A. Hall y D. S. Jackson, Eds.) pp 333-393, Academic Press, New York.
- Rojkind, M. y J. G. Valadez (1985) *Ciba Foundation Symposium* 114, 208-221.
- Rojkind, M., M. Reyes-Romero, J. Cerbón-Ambríz y M. Rosas (1984) En: *Pharmacological, morphological and physiological aspects of liver aging* (C.F.A. van Bezooijen, Ed.) pp 59-70, Eurage, Rijswijk.
- Rojkind, M., M. A. Giambrone y L. Biempica (1979) *Gastroenterology* 76, 710-719.
- Rojkind, M., M. H. Rojkind y J. Cordero-Hernandez (1983) *Coll. Rel. Res.* 3, 335-347.
- Ross, R. (1968) *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 43, 51-96.
- Roser, B. (1968) *J. Reticuloendothel. Soc.* 5, 455-465.
- Rudolph, R., W. J. Mc Clure y M. Woodward (1979) *Gastroenterology* 76, 704-709.
- Ruoslahti, E., E. Engvall y E. Hayman (1981) *Coll. Rel. Res.* 1, 95-128.
- Scheuer, P. J. y G. Maggi (1980) *Histopathology* 4, 487-490.
- Seyer, J. M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 490-498.
- Seyer, J. M., E. T. Hutchenson y A. H. Kang (1977) *J. Clin. Invest.* 59, 241-247.

- Sharma, S. D. y W. F. Piessens (1978) *Cell. Immunol.* 38, 276-282.
- Snyder, J. A. y J. R. Mc Intosh (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45, 699-725.
- Solomkin, J. S. y R. L. Simmons (1983) *Surgical Clinics of North America* 63, 225-243.
- Starkey, R., S. Cohen y D. Orth (1975) *Science* 189, 800-802.
- Stern, H. S., J. G. Mc Afee y G. Subramanian (1966) *J. Nucl. Med.* 7, 665-683.
- Stuart, K. L., J. A. Habeshaw y A. E. Davidson (1979) En: *Handbook of Experimental Immunology*" (D.W. Weir, Ed.) 3a. Ed. Vol. 2 pp 31.1-31.30, Blackwell, Oxford.
- Sunada, H. y Y. Nagai (1983) *Biomedical Res.* 4, 61-70.
- Szmunes, W., C. E. Stevens, E. A. Zang, E. J. Harley y A. Kellner (1981) *Hepatology* 1, 377-385.
- Tanikawa, K. (1968) En: *"Ultrastructural Aspects of the Liver and its Disorders"* Springer-Verlag. Berlin y New York.
- Tsukamoto, Y., W. E. Hessel y S. M. Wahl (1981) *J. Immunol.* 127, 673-681.
- Unanue, E. R. (1976) *Am. J. Pathol.* 83, 395-418.
- Väänänen, K. y E. Kulonen (1984) *Colagen Rel. Res.* 123, 456-458..
- Vaheri, A., E. Ruoslahti, B. Westermarck y J. Pontén (1976) *J. Exp. Med.* 143, 64-72.
- Voss, B., S. Allam, J. Rauterberg, K. Ullrich, V. Gieselmann y K. von Figura (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1348-1354.
- Voss, B., J. Rauterberg, G. Pott, U. Brehmer, S. Allam, R. Lehmann y D. B. Bassenitz (1982) *Hepatology* 2, 19-28.
- Wahl, S. M., y L. M. Wahl (1981) En: *"Lymphokine Report"* (E. Pick y M. Land, Eds.) Vol. 2, pp 179-201, Academic Press, New York.
- Wahl, S. M., y C. L. Gately (1983) *J. Immunol.* 130, 1226-1230.
- Wahl, L. M., S. M. Wahl, S. E. Mergenhagen y G. R. Martin (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 3598-3601.

- Wahl, L. M., C. E. Olsen, S. M. Wahl, J. B. McCarthy, A. L. Sandberg y S. E. Mergenhagen (1979) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 332, 271-278.
- Wahl, S. M., L. M. Wahl y J. B. McCarthy (1978) *J. Immunol.* 121, 942-946.
- Wahl, S. M., Y. Tsukamoto, R. Obrist, J. B. McCarthy y S. E. Mergenhagen (1982) En: "*Connective Tissue of the Normal and Fibrotic Human Liver*" (U. Gerlach, G. Pott, J. Rautenberg y B. Voss, Eds.) pp 50-55, Thieme, Stuttgart.
- Wahl, S. M. y L. M. Wahl (1985) *Cell. Immunol.* 92, 302-312.
- Wake, K. (1974) *J. Cell. Biol.* 63, 683-691.
- Wallace, S. L. (1975) *Arthritis Rheum.* 18, 847-852.
- Wands, J. R. (1979) En: "*Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*" (E. Majchrowicz y E.P. Noble, Eds.) pp 641-658, Plenum, New York.
- Warren, K. S. (1978) *Gut* 19, 572-577.
- Werb, Z. y S. Gordon (1975) *J. Exp. Med.* 142, 361-377.
- West, C. M., R. Lanza, J. Rosenbloom, M. Lowe, H. Holtzer y N. Avdalovic (1979) *Cell* 17, 491-501.
- White, R. R., I. León y C. Kuhn (1981) *J. Reticuloendothel. Soc.* 29, 295-300.
- Widmann, J. J., R. S. Cotran y H. D. Fahimi (1972) *J. Cell. Biol.* 52, 159-170.
- Wisse, E. (1970) *J. Ultrastruct. Res.* 31, 125-150.
- Wisse, E. (1972) *J. Ultrastruct. Res.* 38, 528-562.
- Wisse, E. (1974) *J. Ultrastruct. Res.* 46, 393-426.
- Wyler, D. J., S. M. Wahl y L. M. Wahl (1978) *Science* 202, 438-440.
- Zeitlin, I. J. (1981) *Clin. Rheum. Dis.* 7, 781-797.
- Zurier, R. B., S. Hoffstein y M. Waksman (1973) *J. Cell. Biol.* 58, 27-38.