

11201

8



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Facultad de Medicina
División de Estudios de Postgrado e Investigación**

**Identificación inmunohistoquímica
de la célula estelar hepática en
enfermedades hepáticas metabólicas**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Especialista en Anatomía Patológica

P R E S E N T A :

Dr. Eloy Caballero Mendoza

Asesor: Dr. Arturo Angeles Angeles

Co-asesor: Dr. Edgardo Reyes

Departamento de Patología

Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán



MEXICO, D. F.

277814

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

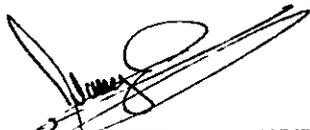


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

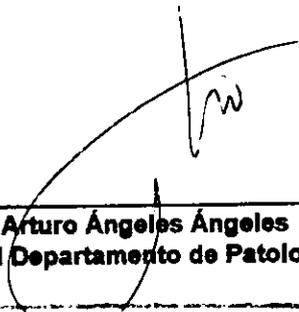
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

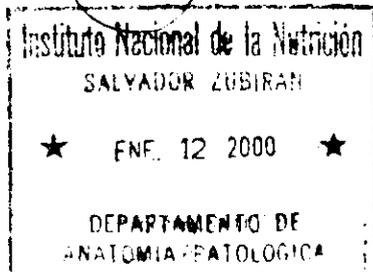
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



Dr. Luis F. Uscanga Domínguez
Jefe del Departamento de Enseñanza I.N.N.S.Z.



Dr. Arturo Ángeles Ángeles
Jefe del Departamento de Patología



A mi madre,
quien dio sentido a mi vida.

Agradecimientos:

A Dios.

A mi País y su gente.

A toda mi familia, especialmente a Roge quién en sus últimos días demostró fortaleza y amor.

A mi segunda madre, yo lo veo así... Lupe.

A mis amigos Olaf, Paula, Hector, Ranulfo, Oliver, Beatriz y Graciela.

Al Dr. Jesús Ancer, Dra. Linda Muñoz y Dra. Victoria Bermúdez.

A todo el personal técnico y secretarial de los Departamentos de Patología del Instituto Nacional de la Nutrición y del Instituto Nacional de Pediatría

Especialmente a mis asesores de tesis y maestros

Dr. Arturo Ángeles Ángeles y Dr. Edgardo Reyes.

A la Dra. Cecilia Ridaura Sanz, con todo respeto y admiración, además de que me proporcionó los bloques de tejido, me contagió de su entusiasmo en el conocimiento de las enfermedades hepáticas en pediatría, nuevamente gracias

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Sección I	2
Generalidades.....	2
Epidemiología de la fibrosis hepática y de la cirrosis.....	3
Nomenclatura	4
Morfología	5
Distribución anatómica de células estelares en el acino hepático del hígado humano de adulto.....	8
Identificación de células estelares hepáticas en hígados normales de humanos.....	9
Productos y componentes de la células estelares hepáticas.....	11
Activación y participación de células estelares en la fibrogenesis humana.....	14
Regulación por citocinas de la activación de células estelares en fibrogenesis.....	14
Sección II.....	17
La célula estelar hepática en enfermedades metabólicas hepáticas.....	17
Objetivos.....	18
Material y métodos.....	19
Resultados	20
Discusión	23
Conclusiones.....	25
Bibliografía.....	26

Resumen

Durante la última década, los estudios *in vitro* conjuntamente con los avances en la biología de citocinas y síntesis de matriz extracelular, han definido nuevos conceptos celulares y moleculares de la fibrosis hepática. A estas investigaciones se suma la caracterización morfológica y funcional de otras poblaciones celulares hepáticas de las cuales la de mayor importancia es la célula estelar hepática. Actualmente se considera la responsable de la síntesis de matriz extracelular y por lo tanto, en condiciones anormales es la promotora de la fibrogénesis hepática.

En la primera sección de esta tesis se analizan la nomenclatura, la morfología, la distribución estructural así como los métodos de identificación de las células estelares. También se describen los productos y los componentes de estas células hepáticas así como su activación y regulación por citocinas.

La segunda sección de la tesis comprende un análisis de la participación de la célula estelar hepática en casos con cirrosis o fibrosis secundarias a enfermedades hepáticas metabólicas. Para este estudio se utilizaron muestras de hígados de autopsias de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría. Se determinó la presencia, el número y la distribución de las células estelares hepáticas posterior al inmunomarcaje contra a-actina de músculo liso. Las enfermedades metabólicas hepáticas estudiadas fueron glucogenosis tipo 1, Wolman, Niemann-Pick, gangliosidosis GM-1, Gaucher, hemocromatosis neonatal y cirrosis de la India. Los resultados mostraron proliferación de

células estelares positivas a α -actina de músculo liso en la periferia de los septos fibrosos. Estos hallazgos nos permiten considerar a la célula estelar hepática como la efectora de la fibrosis hepática en padecimientos con ausencia de inflamación.

SECCIÓN I

Introducción y generalidades

En el espacio de Disse del hígado, existe una célula conocida con diversos nombres, que actualmente se le designa como célula estelar hepática. Esta célula fue descrita en 1876 inicialmente por von Kupffer y se confundió con macrófagos hepáticos o células Kupffer.¹ En 1882, Rothe propuso que estas células se distribuían en la periferia de los vasos y sugirió que se originaban del sistema nervioso por su afinidad al cloruro de oro.² Fue hasta 1952 que Ito y Nemoto demostraron que la célula descrita por von Kupffer no era una célula macrofágica, se localizaba por debajo del endotelio sinusoidal y tenían capacidad de almacenar lípidos.³ Wake y colaboradores posteriormente describieron su función de almacenaje de vitamina A.⁴ A partir de entonces, diversos estudios *in vitro* y en animales han tratado de definir las funciones de la célula estelar en condiciones normales, anormales y en particular durante la fibrogénesis hepática.

La fibrosis hepática es la respuesta común al daño hepático crónico independientemente de la etiología, entre las cuales se incluyen alcohol, infecciones persistentes virales y helmínticas así como enfermedades hereditarias caracterizadas por depósito de metales. La evidencia científica acumulada ha demostrado que los mecanismos de fibrosis hepática son similares independientemente de sus causas. Además, la respuesta mesenquimatosa hepática es un paradigma cuando se compara con la que ocurre en otros tejidos.

El cultivo y la caracterización de la célula estelar hepática, en conjunción con los recientes progresos en la biología de citocinas y de la síntesis de matriz extracelular, han permitido incrementar el conocimiento de las bases celulares y moleculares de la fibrosis hepática. En particular, la célula estelar hepática es considerada la principal vía celular de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular durante el daño hepático crónico.

Durante los últimos 10 años, las investigaciones en fibrosis hepática y cirrosis han permitido cambiar el concepto estático e irreversible de estos procesos a una condición dinámica y potencialmente reversible. Estas investigaciones incluyen las siguientes áreas: 1) caracterización de componentes de la matriz extracelular, 2) identificación de tipos celulares responsables de la acumulación de matriz extracelular, 3) definición de la respuesta celular a la matriz extracelular, particularmente de integrinas como el principal receptor mediador de las interacciones célula-matriz extracelular, 4) papel de las citocinas en la estimulación de las respuestas celulares durante el daño y la reparación, así como la caracterización de sus receptores, y 5) sobreposición y regulación de proteasas degradantes de matriz extracelular.

Epidemiología de la fibrosis hepática y de la cirrosis

La incidencia y prevalencia de la cirrosis se desconoce, debido a que en la mayoría de los pacientes la enfermedad es subclínica. En ciertos pacientes, la cirrosis es un hallazgo del estudio posmórtem. Así, en un estudio de revisión en relación a la sensibilidad del diagnóstico antemórtem, éste fue del 60%.⁶

Actualmente la identificación de pacientes con riesgo de desarrollar cirrosis se ha incrementado, de tal forma que la prevalencia de cirrosis también se podría ver aumentada. Los principales factores de riesgo para cirrosis son hepatitis crónica por virus B y C, abuso constante de alcohol y acumulación de metales como el hierro. Aproximadamente 40 % de los casos de cirrosis se asocian con consumo constante de alcohol, seguidos de infecciones crónicas virales. La cirrosis hepática está considerada entre las diez causas principales de muerte en Estados Unidos de Norteamérica, México y otros países de América.⁷

Nomeclatura de la células estelares hepáticas

En la literatura médica se han utilizado diversos nombres para designar a las células estelares hepáticas. Esta nomenclatura se ha basado en características morfológicas, propiedades funcionales, localización en el parénquima hepático e inclusive se ha utilizado el nombre del autor que haya descrito algunas de sus propiedades. En el Cuadro 1 se listan algunos de los nombres dados a esta célula. El nombre o término que la define mejor es célula estelar hepática, sobre todo por que da el mérito al Dr. Arbeit von Kupffer, quién fue el primero que la describió, y también a que automáticamente describe sus propiedades morfológicas, sin indicar ninguna de sus múltiples, transitorias y variadas capacidades funcionales.

Cuadro 1 Nomenclatura utilizada para referirse a la célula estelar hepática

Zinnoberrzellen	Célula de Kupffer
Stemzellen	Célula almacenadora de lípidos
Célula granular	Célula perisinusoidal
Célula intersticial	Célula sinusoidal
Lipocito hepático	Célula Ito
Pencito hepático	Célula estelar hepática

Morfología de la célula estelar hepática

Las células estelares hepáticas están localizadas en el espacio de Disse, debajo de la capa de células endoteliales y en relación con los hepatocitos. Estas células pueden tener contacto directo con nervios terminales. Las células estelares tienen largas prolongaciones citoplasmáticas cuyo número varía de 1 a 6, pueden ser fusiformes o sus prolongaciones citoplásmicas pueden rodear total o parcialmente al hepatocito (Figura 1).

En relación a sus funciones, un aspecto peculiar de la célula estelar es la capacidad de expresión fenotípica dual. En el hígado sano, las células muestran fenotipo inactivo o quiescente, que es estático y está relacionado con la capacidad de almacenamiento de vacuolas de lípidos con vitamina A. En esta etapa la célula estelar es pequeña, tiene pocos organelos, sin prolongaciones citoplasmáticas, muestran bajo índice de proliferación, y es imperceptible con las tinciones de rutina. En la enfermedad hepática crónica,

las células estelares adquieren fenotipo de células activadas por lo que muestran diferenciación celular similar al miofibroblasto. Tienen alta capacidad de proliferación, disminución del contenido de vitamina A, con abundante retículo endoplásmico rugoso así como numerosos microtúbulos y nidos de filamentos de actina con condensaciones locales. Además adquieren marcadores fenotípicos tales como la expresión de α actina de músculo liso y de receptores para diversas citocinas (Figura 2). Estas características de las células estelares se han identificado en hígados de humanos, pero existen variaciones en la expresión fenotípica, en sus funciones y en su regulación dependiendo de la especie estudiada

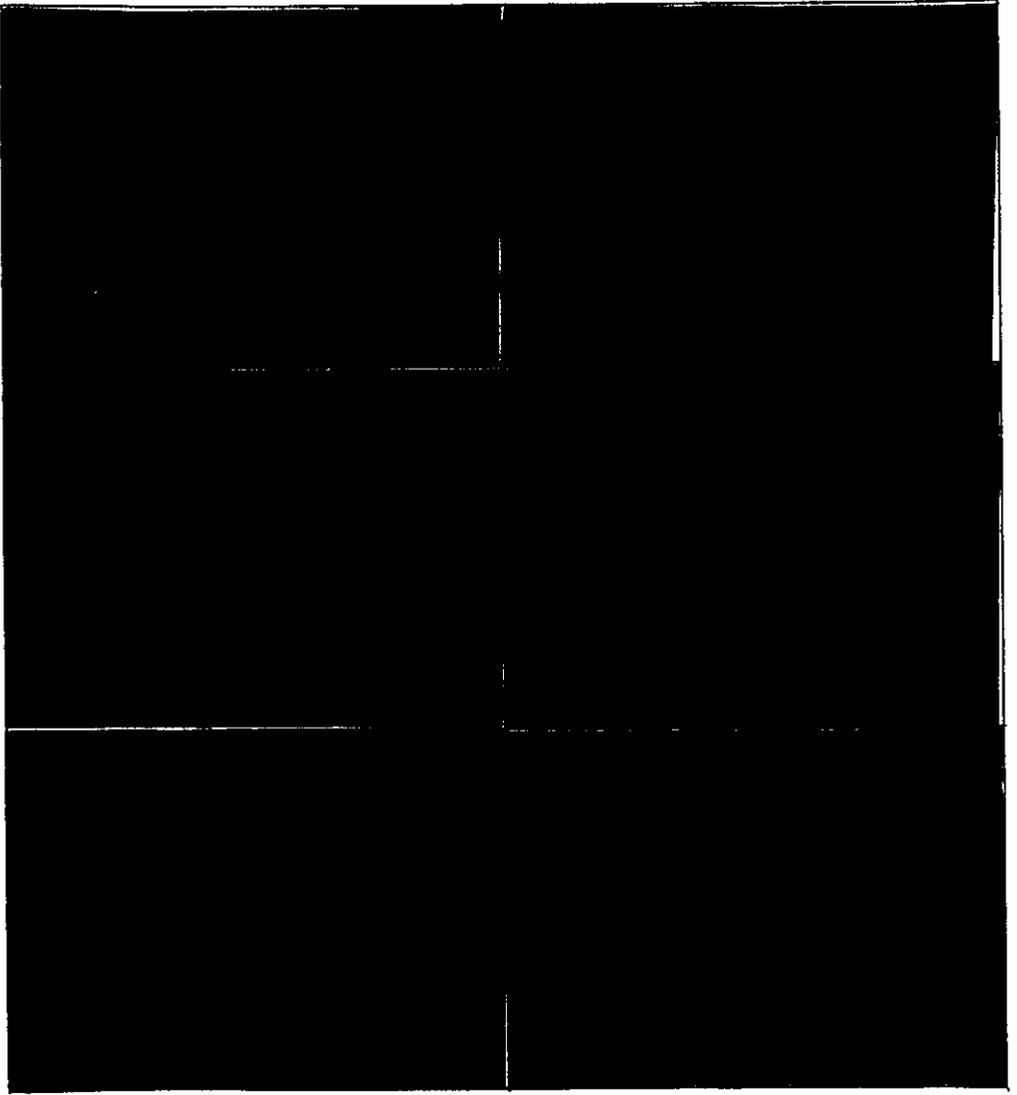


Figura 1.-Espectro morfológico de la célula estelar hepática activada. Inmunomarcaje contra α actina de músculo liso (100x). a) unipolar, b) bipolar, c) tripolar, d) tetrapolar, e) pentapolar y f) perihepatocítica.

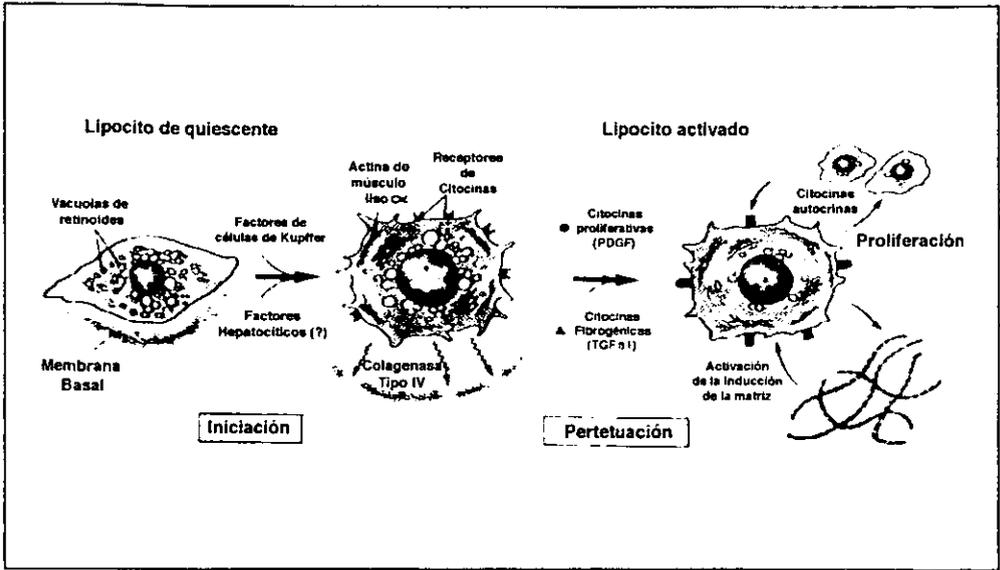


Figura 2.- Representación esquemática de la activación de la célula estelar hepática inactiva (lipocito) y su transformación a célula estelar hepática activada.

Distribución anatómica de células estelares en el acino hepático humano del adulto

Los estudios iniciales de las células estelares sugerían que se localizaban principalmente en la zona periportal. Sin embargo, actualmente se sabe que la célula estelar hepática activada puede localizarse indistintamente en todo el acino hepático, pero con cierta distribución especial. Las zonas periportal y perivenular son los sitios donde se identifican células estelares activadas en mayor cantidad, principalmente en condiciones patológicas. Algunas de nuestras observaciones sobre la célula estelar nos han permitido

establecer que el inicio de la activación de la célula estelar puede ser el lobulillo hepático. Otra característica en relación a la distribución acinar de la célula estelar en daño hepatocelular crónico, es que puede adquirir patrones de distribución muy variables, similares a los descritos para la fibrosis hepática tales como: capilarización de sinusoides focal o difusa, periportal, perivenular, en puente porto-portal y porto-central, peritumoral (cápsula) y periductal, entre otras.

Identificación de células estelares hepáticas en hígados normales de humanos

Las células estelares hepáticas no se observan en cortes histológicos procesados en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina. Para su identificación son necesarios métodos como microscopía electrónica e inmunohistoquímica (Cuadro 2). Sin embargo, algunas técnicas histológicas son útiles para demostrar la célula estelar hepática inactiva basadas en las características de los lípidos acumulados. Además, estas células con fenotipo inactivo pueden ser identificadas por la propiedad de autofluorescencia de la vitamina A, ya que inducen color azul-verde a 328 nm. Utilizado en estudios experimentales en humanos y en pacientes con intoxicación por vitamina A, pero en otras condiciones este proceso resulta impráctico. El método de impregnación con cloruro de oro permite revelar a las células estelares del hígado debido a la presencia de vitamina A, pero con resultados inconstantes; en el hígado humano, con este método las células estelares se observan principalmente en las áreas centrolobulares. La proteína celular de unión a

retinol, es útil para revelar la célula estelar y es dependiente de la capacidad de almacenaje de vitamina A⁸. El análisis por microscopía electrónica permite definir algunas características de la célula estelar, las cuales incluyen: presencia de vacuolas de lípidos que comprimen el núcleo, retículo endoplásmico rugoso moderadamente desarrollado, cuentas variables de elementos del citoesqueleto, escasas mitocondrias y presencia de largos procesos citoplasmáticos bajo el endotelio.

Cuadro 2. Métodos de identificación y marcadores para células estelares hepáticas humanas.

Método	Células estelares inactivas	Células estelares activas (miofibroblastos)
Histoquímica		
azul de toluidina	+	-
fuchina básica	+	-
rojo oleoso	+	-
Microscopía electrónica	+	-
Identificación de Vitamina A		
autofluorescencia	+	-
cloruro de oro	+	-
proteína celular de unión a retinol	+	?
Inmunohistoquímica		
desmina	-	-
proteína ácida glial fibrilar	+ periportal	+ pocas células
vimentina	+	+
actina de músculo liso	+	+
N-CAM	+ periportal	?

El método de inmunohistoquímica contra proteínas del citoesqueleto es útil, práctico y disponible comercialmente. En el hígado normal del humano, el inmunomarcaje contra desmina y α -actina de músculo liso tienen utilidad limitada. Sin embargo, variaciones en la técnica de inmunomarcaje contra α -actina de músculo liso permiten mayor precisión para identificarlas en el

hígado humano.⁹⁻¹⁰ Las células estelares muestran positividad para este marcador en la periferia del citoplasma y puede tener patrón granular citoplasmático. La vimentina se expresa ocasionalmente en células estelares pero además tiñe macrófagos y células endoteliales, por lo no se utiliza rutinariamente. La proteína ácida glial fibrilar está limitada a una subpoblación de células estelares localizadas en la región periportal, esto es similar a lo reportado para la molécula de adhesión celular neuronal (N-CAM).^{11,12} Los patrones de expresión de filamentos intermedios por células estelares son variables y combinados, sugiriendo que existen poblaciones heterogéneas que también guardan relación con la distribución zonal en el acino hepático. Las causas y significados funcionales de esta heterogeneidad de las células estelares son aún desconocidos.

Productos y componentes de la células estelares hepáticas

La célula estelar hepática ha mostrado ser capaz de sintetizar gran variedad de productos y componentes en relación a diversas condiciones; estos componentes tienen diversas funciones probablemente relacionadas con la fibrogénesis (Cuadro 3). El estudio de los productos de las células estelares hepáticas permite definir nuevas estrategias terapéuticas para regular la fibrosis hepática. Se debe recordar que los mecanismos de fibrogénesis hepática asociados con alcohol e infecciones vírales crónicas son completamente diferentes a los asociados con hemocromatosis u otras enfermedades metabólicas hereditarias; sin embargo, en todos estos padecimientos el efecto final común es fibrosis y cirrosis. Por lo tanto, conocer

los mecanismos de la regulación de la fibrogénesis hepática dependen del padecimiento de base o del tipo específico de daño hepatocelular.

La fibrosis hepática se define como incremento de la matriz extracelular y no simplemente comprende el colapso del parénquima existente. Para el establecimiento de la fibrosis, además del aumento predominante de colágena tipo I se suman cambios cuantitativos y cualitativos de los componentes de la matriz extracelular como laminina, fibronectina y tenascina.

Cuadro 3. Productos y componentes de las células estelares hepáticas resultados de estudios *n vivo* e *in vitro* en diversas especies.

Compuestos relacionados con vitamina A y lípidos	
Retinoides	retinol, ésteres de retinilo, retroretinoides
Proteínas de unión	CRBP, CRABP, RPB (controverial)
Enzimas	hidrolasa de retinil-palmitato, acetilcoenzima A, retinilaciltransferasa
Receptores nucleares de retinoides RAR α , RAR β	
Apolipoproteínas	Apo E, Apo A-1, Apo A-IV (controverial)
Marcadores de citoesqueleto	Vimentina, desmina, α actina de músculo liso, proteína ácida glial fibrilar (activación especie dependiente)
Enzimas y componentes de detoxificación	
Enzimas	GST α , μ , π ; y glutamiloistena transferasa, ADH, glutation peroxidasa, PAF acetiltransferasa y acetilhidrolasa
Componentes	Glutation
Matriz extracelular	
Colágenas	tipos I, III, IV, V, VI, XIV
Proteoglicanos	Sulfatos de heparan, dermatan y condroitin
Glicoproteínas	perlecan, sindecán-1, biglican, decorin, fibronectina celular, laminina, merosina, tenascina, nidogena/entactina, undulina, ácido hialurónico
Proteasas e inhibidores	
Proteasas de matriz	MMP-2, estromeliasina-1 (transina), MMP-1 (colagenasa intersticial), MT-MMP (metaloproteinasas de membrana tipo-matriz)
Inhibidores de proteasas	TIMP-1, TIMP-2, PAI-1
Citocinas, factores de crecimiento y mediadores inflamatorios	
Prostanoides	Prostaglandinas F 2α , D 2 , I 2 , E 2 Leucotrienos C 4 , B 4
Mediadores leucocitarios	M-CSF, MCP-1, PAF
Componentes de fase aguda	α 2, macroglobulina
Mitógenos	Interleucina 6
Mediadores vasoactivos	HGF, EGF, PDGF, SCF, IGF I y II, α FGF
Componentes fibrogénicos	endotelina-1, óxido nítrico
Factores de crecimiento	TGF β -1, TGF β -2, TGF β -3, eritropoyetina
Receptores	
Receptores para citocinas	PDGF-R, TGF tipos I, II y III, ET-R, EGF-R, ferritina, trombina-r, manosa 6-fosfato-r, uPA, uPA-r
Factores de transcripción y moléculas de señal	
Componentes de señal	Ra1/rar y MAP cinasa
Factores de transcripción	Sp1, NF κ B, c-myc

Activación y participación de células estelares en la fibrogénesis humana

La fibrosis hepática típicamente requiere de daño crónico. Las causas por las cuales es necesario el evento de cronicidad se desconocen, pero podrían reflejar la existencia de mediadores exclusivos de cronicidad, o bien de alteraciones en los mecanismos compensadores. En experimentos con diversos tipos de daño hepático, se ha demostrado la activación de células estelares y el depósito de matriz extracelular. Así se ha establecido que durante el daño hepático experimental, al igual que en cirrosis humana, es característico el depósito de matriz extracelular predominantemente por colágena tipo I.¹³⁻¹⁴ Otros estudios han confirmado los cambios cuantitativos y cualitativos de los componentes de matriz extracelular en especial proteoglicanos sulfatados, laminina, fibronectina y tenascina. Los resultados de estos informes en pacientes alcohólicos, infección viral, daño biliar y otras lesiones, sugieren un mecanismo de daño crónico similar y han reforzado el concepto de fibrosis humana en estudios con biopsias.

Regulación por citocinas de la activación de células estelares en fibrogénesis

La activación de la célula estelar hepática consta de dos fases: a) temprana o de iniciación y b) tardía o de perpetuación. La activación temprana al parecer se inicia por dos estímulos principales, uno relacionado con el

depósito de fibronectina y el otro, con factores solubles de la célula Kuppfer. La fase tardía o de perpetuación, consiste de discretos cambios fenotípicos que se listan a continuación: proliferación, fibrogénesis, contractilidad y relación con citocinas proinflamatorias y con proteasas de matriz. Los cambios fenotípicos están relacionados con citocinas como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, endotelina 1, factor de crecimiento parecido a la insulina, trombina y factor de crecimiento transformante α y β . La contractilidad al parecer es un cambio promovido por eicosanoides, óxido nítrico y modificadores del AMP cíclico. Las citocinas proinflamatorias y al parecer productos secretados por leucocitos y células de Kuppfer podrían influir en la regulación de la célula estelar hepática. La secreción de proteinasas degradadoras de matriz se han relacionado con aceleración del reemplazo de matriz en el espacio de Disse.¹⁵⁻¹⁹

SECCION II

Estudio inmunohistoquímico de la célula estelar hepática en enfermedades metabólicas hepáticas con cirrosis

Las células estelares hepáticas activadas se han identificado en pacientes con hepatitis alcohólica, pancreatitis crónica, obstrucción biliar extrahepática, intoxicación hepática por vitamina A y cirrosis biliar primaria.²⁰⁻²³ Algunas enfermedades hepáticas del metabolismo tienen alteraciones celulares que permiten un diagnóstico morfológico, las cuales son clasificadas de la siguiente manera: 1) enfermedades relacionadas con el depósito de sustancias anormales, 2) enfermedades con organelos subcelulares alterados y 3) enfermedades con marcadores tisulares sugestivos de alteraciones metabólicas.²⁴ Los cambios estructurales son el resultado de un defecto metabólico que ayuda a explicar los mecanismos y las manifestaciones clínicas de estas enfermedades complejas.

La fibrosis hepática es la respuesta común de las enfermedades hepáticas crónicas. En humanos, existen diversas etiologías como, alcohol, infección viral o helmíntica persistente y alteraciones en la acumulación de metales.²⁵ En estos padecimientos hay un componente inflamatorio prominente, particularmente en las enfermedades hepáticas virales y helmínticas o en las inducidas por el alcohol. En contraste, la fibrosis hepática relacionada con alteraciones congénitas del metabolismo no tiene componente inflamatorio; esto permite postular que que la necrosis de células parenquimatosas y la fibrosis tienen relación directa con la activación de células estelares.²⁶

Los mecanismos de fibrogénesis en enfermedades hepáticas agudas y crónicas son similares, y en ambas condiciones la célula estelar hepática es el principal efector.²⁵ Debido a que las fases tempranas de la cascada fibrogénica se inician en el espacio subendotelial de Disse, cualquier esfuerzo por clarificar las vías celulares generadoras de matriz deben centrarse en esta región, y deben incluir a las células endoteliales sinusoidales, hepatocitos y células estelares hepáticas.²⁵

La inmunorreactividad contra α actina de músculo liso es considerada como marcador proteico de la activación fenotípica de la célula estelar hepática activada.^{25, 27} Debido a que los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades hepáticas metabólicas no incluyen inflamación, agentes tóxicos exógenos ni infección viral, nosotros consideramos que son un excelente modelo para el estudio de la fibrosis hepática y de la activación de las células estelares.

Objetivos

1. Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica contra α actina de músculo liso en tejido hepático incluído en parafina y fijado con formol al 10%.
2. Realizar estudio semicuantitativo de las células estelares en hígados de pacientes con enfermedades metabólicas hepáticas.
3. Analizar la distribución zonal de las células estelares hepáticas en hígados de pacientes con enfermedades metabólicas hepáticas.
4. Analizar la relación de las células estelares hepáticas con la fibrosis en hígados de pacientes con enfermedades metabólicas hepáticas.

Los mecanismos de fibrogénesis en enfermedades hepáticas agudas y crónicas son similares, y en ambas condiciones la célula estelar hepática es el principal efector.²⁵ Debido a que las fases tempranas de la cascada fibrogénica se inician en el espacio subendotelial de Disse, cualquier esfuerzo por clarificar las vías celulares generadoras de matriz deben centrarse en esta región, y deben incluir a las células endoteliales sinusoidales, hepatocitos y células estelares hepáticas.²⁵

La inmunorreactividad contra α actina de músculo liso es considerada como marcador proteico de la activación fenotípica de la célula estelar hepática activada.^{25, 27} Debido a que los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades hepáticas metabólicas no incluyen inflamación, agentes tóxicos exógenos ni infección viral, nosotros consideramos que son un excelente modelo para el estudio de la fibrosis hepática y de la activación de las células estelares.

Objetivos

1. Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica contra α actina de músculo liso en tejido hepático incluído en parafina y fijado con formol al 10%.
2. Realizar estudio semicuantitativo de las células estelares en hígados de pacientes con enfermedades metabólicas hepáticas.
3. Analizar la distribución zonal de las células estelares hepáticas en hígados de pacientes con enfermedades metabólicas hepáticas.
4. Analizar la relación de las células estelares hepáticas con la fibrosis en hígados de pacientes con enfermedades metabólicas hepáticas.

Material y Métodos

Tejidos

Especímenes de tejido hepático de pacientes con enfermedades hepáticas metabólicas obtenidos durante el procedimiento de autopsia. En todos los casos estudiados el diagnóstico de enfermedad metabólica hepática fue realizado en bases histológicas, microscopía electrónica, tinciones de histoquímica y correlación con la información clínica pertinente.

Inmunohistoquímica

El inmunomarcaje contra α actina de músculo liso fue realizado en tejido fijado en formalina e incluido en parafina. Inicialmente el tejido fue pretratado con H₂O₂ /metanol y suero de caballo normal como bloqueador. Posteriormente, se incubaron durante 24 horas a 4 °C con anticuerpo anti- α músculo liso a una dilución 1:30. La primera incubación fue seguida del marcaje utilizando el sistema ABC-P de acuerdo con las instrucciones de la compañía. La actividad de la estreptavidina biotinilada fue revelada con 30% 3,3 diaminobencidina. Las laminillas fueron contrastadas con hematoxilina de Mayer, deshidratadas y montadas. Los controles fueron realizados utilizando IgG de ratón como anticuerpo primario.

Evaluación

Los siguientes aspectos fueron estudiados: patrones de la positividad de las células estelares hepáticas contra α actina de músculo liso, localización de las células estelares en el acino hepático y relación de las células estelares con la fibrosis hepática.

El número de células α actina de músculo liso positivas se determinó independientemente por dos patólogos; en zonas que incluían acinos hepáticos completos y analizados en forma aislada en las porciones periportal, intermedia y perivenular.

En forma arbitraria, la inmunorreactividad a α actina de músculo liso fue categorizada en cruces, de la siguiente manera: 0, patrón normal de la actina muscular lisa en células de músculo liso de vasos, 1+ escasas células estelares activadas, 2+ positividad contra la actina muscular lisa periportal con proliferación de células estelares, 3+ septos o puentes entre espacios porta con células estelares activadas, 4+ expresión de la actina de músculo liso en bandas de tejido conectivo que limitan a nódulos de regeneración.

Resultados

Los patrones de inmunorreactividad relacionados con diferentes enfermedades metabólicas hepáticas son mostrados en el Cuadro 4 .

Cuadro 4. Distribución acinar y relación con fibrosis de células estelares hepáticas en hígados de pacientes con enfermedades metabólicas hepáticas. Inmunomarcaje anti α actina de músculo liso

Enfermedad	Periportal	Intermedia	Perivenular	Perisinusoidal	Septo fibroso
von Gierke, tipo 1	++	-	++	-	--
Enfermedad de Wolkmán	+++	+++	+++	+++	+++
Nieman-Pick	+++	+	++	+++	++
Gangliosidosis Tay Sachs	++	+	++	++	-
Enfermedad de Gaucher	+++	++	+++	+++	++
Hemocromatosis	+++	++	+++	+++	+++
Cirrosis infantil de la India	+++	++	+++	+++	+++

El número de células α actina de músculo liso positivas se determinó independientemente por dos patólogos; en zonas que incluían acinos hepáticos completos y analizados en forma aislada en las porciones periportal, intermedia y perivenular.

En forma arbitraria, la inmunorreactividad a α actina de músculo liso fue categorizada en cruces, de la siguiente manera: 0, patrón normal de la actina muscular lisa en células de musculo liso de vasos, 1+ escasas células estelares activadas, 2+ positividad contra la actina muscular lisa periportal con proliferación de células estelares, 3+ septos o puentes entre espacios porta con células estelares activadas, 4+ expresión de la actina de músculo liso en bandas de tejido conectivo que limitan a nódulos de regeneración.

Resultados

Los patrones de inmunorreactividad relacionados con diferentes enfermedades metabólicas hepáticas son mostrados en el Cuadro 4 .

Cuadro 4. Distribución acinar y relación con fibrosis de células estelares hepáticas en hígados de pacientes con enfermedades metabólicas hepáticas. Inmunomarcaje anti α actina de músculo liso

<i>Enfermedad</i>	<i>Periportal</i>	<i>Intermedia</i>	<i>Perivenular</i>	<i>Pensinusoidal</i>	<i>Septo fibroso</i>
von Gierke, tipo 1	+	-	++	-	--
Enfermedad de Wolkman	+++	+++	+++	+++	+++
Nieman-Pick	+++	+	++	+++	++
Gangliosidosis Tay-Sachs	++	+	++	++	-
Enfermedad de Gaucher	+++	++	+++	+++	++
Hemocromatosis	+++	++	+++	+++	+++
Cirrosis infantil de la India	+++	++	+++	+++	+++

El incremento de α actina de músculo liso expresado en células estelares hepáticas se encontró en áreas relacionadas con degeneración hepatocelular y fibrosis sin respuesta inflamatoria. En algunos casos se identificaron zonas de fibrosis pericelular en “tela de gallinero” o bien de capilarización de sinusoides principalmente en la zona intermedia del acino hepático (Figura 3).

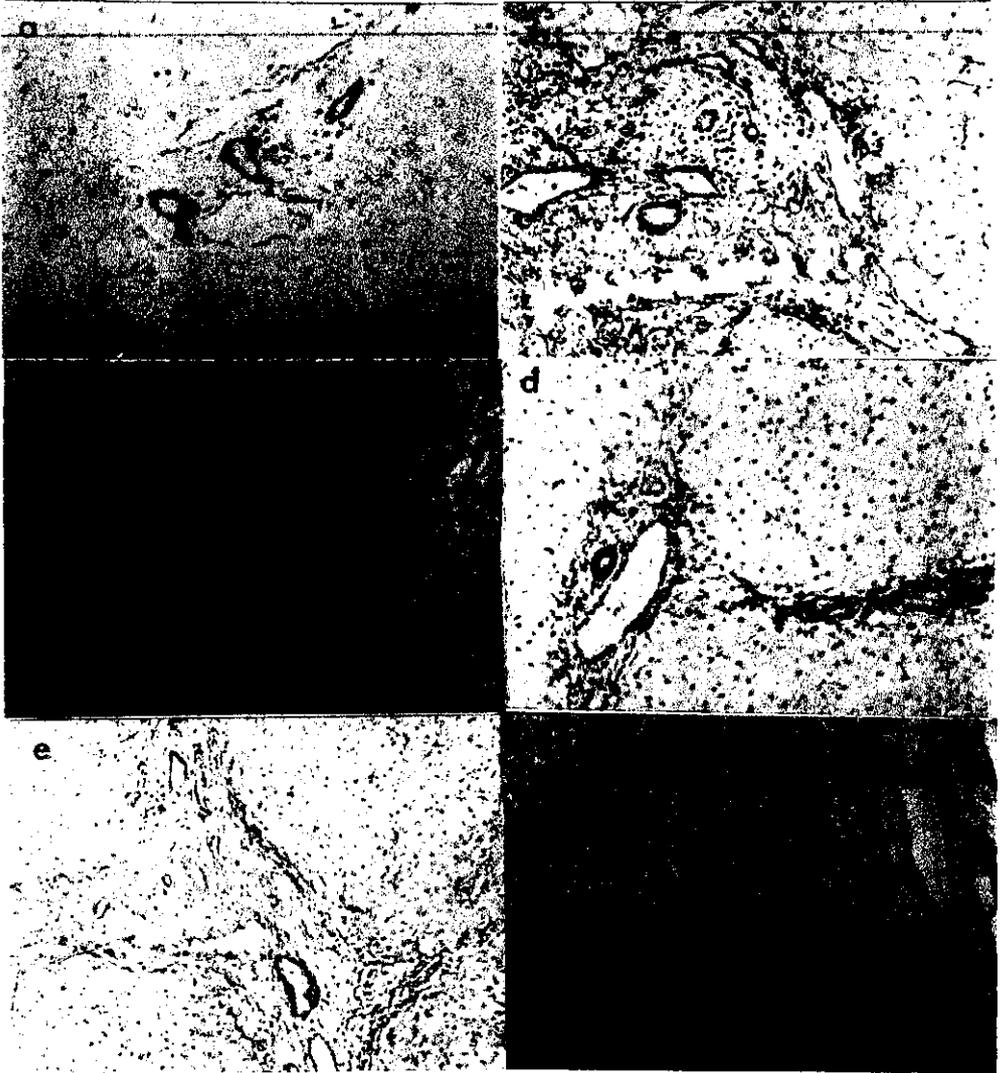


Figura 3. Patrones de distribución de células estelares en enfermedades metabólicas hepáticas. Inmunomarcaje contra α actina de músculo liso, a) enfermedad de von Gierke, tipo I, b) enfermedad de Wolman, c) enfermedad de Nieman-Pick, d) gangliosidosis GM-1, e) enfermedad de Gaucher y f) hemocromatosis neonatal.

Discusión

Los mecanismos moleculares de activación y regulación de células estelares son investigados actualmente para elucidar la patogénesis de la fibrosis hepática y desarrollar estrategias terapéuticas contra la cirrosis²⁵. En general, las células no parenquimatosas del hígado son consideradas las vías principales de producción de colágena en hígados normales y con fibrosis.²⁸⁻³³ Algunos autores han demostrado que los hepatocitos también participan como células activas en la síntesis de colágena³⁴⁻³⁶. Sin embargo, en dos modelos de inducción de fibrosis hepática con CCl_4 ²⁹ y fibrosis biliar experimental, se ha mostrado incremento en las cuentas transcritas de procolágena α -2 (I), α -1 (III), ND α -1 (IV) en células asociadas con septos fibrosos en expansión así como en células estelares, pero no en los hepatocitos²⁹⁻³⁰.

En nuestro análisis fue de gran interés, encontrar abundantes células estelares hepáticas activadas anti α actina de músculo liso en relación a daño hepático sin inflamación. Este resultado no ha sido informado en la literatura. De tal forma que nuestros hallazgos indican que en diversas enfermedades metabólicas del hígado con fibrosis hepática, existe incremento de células estelares. Se debe recordar que las alteraciones morfológicas en estos hígados se caracterizan por fibrosis y necrosis de hepatocitos en ausencia de inflamación aguda o crónica.

Knittel y colaboradores han sugerido que las células estelares hepáticas podrían ser importantes durante el daño tisular hepático inducido por elementos proinflamatorios, interactuando con células con ligandos de unión a I-CAM-1 y V-CAM-1 y a otros inmunomoduladores como el antígeno 1

asociado con la función del linfocito o la activación tardía de Mac-1/antígeno 4 positivo. Los cuales podrían modular el reclutamiento y migración de células mononucleares hacia el espacio perisinusoidal.³⁷

En nuestro estudio encontramos una alta proporción de células positivas anti- α actina de músculo liso en relación directa con los septos fibrosos. Los hallazgos de Ram y colaboradores³⁸ sugieren que existen interacciones importantes entre diferentes poblaciones celulares, que son esenciales en la respuesta fibrogénica hepática en pacientes con atresia de vías biliares. Además, poseo evidencia de que las células estelares son las responsables de la producción incrementada de colágena y por lo tanto, participan directamente en el desarrollo de fibrosis hepática.

El inmunomarcaje de células estelares para anti α actina de músculo liso fue más acentuado en hígados con estadios avanzados de fibrosis y cirrosis en comparación con aquéllos sin daño activo. Además, una alta proporción de estas células positivas fue detectada en la zona intermedia con patrón en "tela de gallinero" o de fibrosis pericelular. En el contexto de este estudio con enfermedades hepáticas metabólicas, la cantidad observada de células estelares activadas plantean que son el principal efector de la fibrogénesis. Esto en base a que en las enfermedades analizadas no existen células inflamatorias y por lo tanto, señalan el papel secundario y limitado de la inflamación para generar fibrosis.

Estudios recientes han demostrado que el factor de crecimiento transformante β -1 inhibe la proliferación de células almacenadoras de lípidos con el consiguiente acúmulo de colágena in vitro³⁹ La interleucina 1 α y el factor de necrosis tumoral α tienen efecto mitógeno, pero inducen inhibición de la

formación de colágena. Ello ha permitido especular que estas citocinas podrían modular la expresión de α actina de músculo liso en células hepáticas del parénquima hepático.⁴⁰

De gran importancia son los estudios in vitro donde se ha demostrado la disminución de expresión de α actina de músculo liso en células estelares hepáticas y miofibroblastos inducida por interferón-gamma⁴¹⁻⁴². La información de estos estudios permite deducir el adecuado efecto terapéutico que el interferón gamma podría tener en enfermedades hepáticas metabólicas, al inactivar las células estelares hepáticas.

Conclusiones

En este estudio de pacientes con enfermedades hepáticas metabólicas el marcaje inmunohistoquímico contra α actina de músculo liso, permitió identificar células estelares hepáticas activas. Se encontraron abundantes células estelares hepáticas positivas para α actina de músculo liso, sin relación con inflamación. Esto, sugiere que estas células son el principal efector de la fibrogénesis. Las células estelares hepáticas se identificaron frecuentemente en relación con los septos fibrosos de hígados. En estos padecimientos hepáticos metabólicos la inflamación tiene papel secundario y limitado en la fibrogénesis.

formación de colágena. Ello ha permitido especular que estas citocinas podrían modular la expresión de α actina de músculo liso en células hepáticas del parénquima hepático.⁴⁰

De gran importancia son los estudios in vitro donde se ha demostrado la disminución de expresión de α actina de músculo liso en células estelares hepáticas y miofibroblastos inducida por interferón-gamma⁴¹⁻⁴². La información de estos estudios permite deducir el adecuado efecto terapéutico que el interferón gamma podría tener en enfermedades hepáticas metabólicas, al inactivar las células estelares hepáticas.

Conclusiones

En este estudio de pacientes con enfermedades hepáticas metabólicas el marcaje inmunohistoquímico contra α actina de músculo liso, permitió identificar células estelares hepáticas activas. Se encontraron abundantes células estelares hepáticas positivas para α actina de músculo liso, sin relación con inflamación. Esto, sugiere que estas células son el principal efector de la fibrogénesis. Las células estelares hepáticas se identificaron frecuentemente en relación con los septos fibrosos de hígados. En estos padecimientos hepáticos metabólicos la inflamación tiene papel secundario y limitado en la fibrogénesis.

Bibliografía

- 1.-Von Kupffer C. Ueber sternzellen der leber. Briefliche mittheilung an prof. Waldeyer. Arch mikr Anat 1876; 12: 353-358.
- 2.-Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference with special reference to storage of vitamin A. Am J Anat 1967; 132: 429-462.
- 3.-Ito T, Nemoto M. ber die Kupfferschen sternzellen und die "fettspeicherungszellen" ("fat-storing cells") in der blutkapillarenwand der menschlichen leber. Okajimas Folia Anat Jpn 1952; 24: 243-258
- 4.-Wake K, Kishiye T, Yamamoto H, Bhunchet E, Sakamoto Y, Sato T. Kupffer cells modulate the configuration of perisinusoidal stellate cells. In: Knook DL, Wisse E (eds) Cells of the hepatic sinusoid, vol 4. The Kupffer cell foundation, Leiden, pp 157-60
- 5.-Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. J Gastroenterol 1997; 32:424-430.
- 6.-Dufour MC, Stinson FS, Caces MF. Trends in cirrhosis morbidity and mortality: United States 1979-1988. Sem Liver Dis 1993; 13:109-125
- 7.-Secretaría de prevención y control de enfermedades. Dirección general de estadística e informática. Secretaria de Salud de México. 1997.
- 8.-Hautekeete ML, Geerts A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. Virchows Arch 1997;430:195-207
- 9.-Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Saibara T, et al. Immunohistochemical identification of Ito cells and their myofibroblastic transformation in adult human liver. Virchows Arch 1994; 424:249-256.
- 10.-Yamaoka K, Nouchi T, Kuroda H, Sato C. α -smooth muscle actin expression in normal and fibrotic human livers

Dig Dis Sci 1993; 38:1473-1479

11.-Hautekeete ML, Niki T, Van den Berg K, Delvaux G, Geerts A. A fraction of stellate cells in human liver express glial fibrillary acidic protein (GFAP) J Hepatol 1996, (suppl 1), 25:112.,

12.-Knittel T, Aurisch S, Neubauer K, Eichhorst S, Ramadori G. Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver: upregulation during in vitro activation and in hepatic tissue liver J Hepatol (suppl1) 1996; 25:113

13.-Rodjkind M, Giambone MA, Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic human liver. Gastroenterology 1979; 710-719.

14.-Seyer JM, Friedman SL, Bissell DM. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. J Clin Invest 1979; 59: 241-248

15.-Pinzani M, Abboud HE, Gesualdo L, Abboud SL. Regulation of macrophage colony-stimulating factor in liver fat-storing cells by peptide growth factors. Am J Physiol 1992; 262: C876-881.

16.-Friedman SL, Arthur MJP. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cells conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. J Clin Invest. 1989; 84: 1780-1785

17.-Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. J Clin Invest 1994; 94: 1563-1569

18.-Pinzani M, Abboud HE, Aron DC. Secretion of insulin-like growth factor-1 and binding proteins by rat liver fat-storing cells. Regulatory role of platelet-derived growth factor. Endocrinology 1990; 127: 2343-2349

- 19.-Marra F, Grandialano G, Valente AJ, Abboud HE. Thrombin stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression monocyte chemotactic protein-1: Potential role in liver injury. *Hepatology* 1995; 22: 780-787
- 20.-Bronfenmajer S, Schaffner F, Popper H. Fat-storing cells (lipocytes) in human liver. *Arch Pathol Lab Med* 1966; 82: 447-453
- 21.-Wake K. Sternzellen in the liver: perisinusoidal cells with special reference to the storage of vitamin A. *Am J Anat* 1971; 132: 429-461
- 22.-Sztark F, Dubroca J, Latry P, Quinton A, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Perisinusoidal cells in patients with normal liver histology. *J Hepatol* 1986; 2: 358-369
- 23.-Cameron RG, Neuman MG, Blendis LM. Multivesicular stellate cells in primary biliary cirrhosis. *hepatology* 1997; 26: 550-553
- 24.-Ridaura-Sanz C. The pathologist's approach to the diagnosis of metabolic disease. *Path Res Pract* 1994; 190: 1109-1122
- 25.-Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies *N Eng J Med* 1993; 25: 1828-1835
- 26.-Bissell DM. Cell matrix interaction and hepatic fibrosis. *Prog Liver Dis* 1990; 9: 143-155
- 27.-Ramadori G, Veit T, Schwogler S, et al. Expression of the gene of the α -smooth muscle-xactin isoform in rat liver and in rat fat stoing (ITO) cells. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1990; 59:349-357
- 28.-Fridman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: The principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:8681-86
- 29.-Milani S, Herbst H, Schuppan D, Hahn EG, Stein H. In situ hybridization for

- procollagen types Y, III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver. Evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 1989; 10:84-92
- 30.-Milani S, Herbst H, Schuppan D, Kim KY, Riecken EO, Stein H. Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology* 1990; 98:175-184
- 31.-Minato Y, Hasumura Y, Takeuchi J, The role of fat-storing cells in Disse space fibrogenesis in alcoholic liver disease. *Hepatology* 1983; 3: 359-366
- 32.-Kent G, Gay S, Inouye T, Bahu R, Minick OT, Popper H. Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 3719-22
- 33.-Pierce RA, Glaug MR, Greco RS, Mackinnzie JW, Boyd CD, Deak SB. Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats *J Bio Chem* 1987; 262: 1652-8
- 34.-Scheffer CGT, Lee PC, Ells PF, Bissell DM, Scuckler EA, Stern R. Collagen production by rat hepatocytes and sinusoidal cells in primary monolayer culture. *Hepatology* 1982; 2: 13-18
- 35.-Saber MA, Zern MA, Shafritz DA Use of in situ hybridization identify collagen and albumin mRNAs in isolated mouse hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 4017-20
- 36.- Chojkier M, Lyche KD, Filip M. Increased production of collagen in vivo by hepatocytes and nonparenchymal cells in rats with carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis *Hepatology* 1988; 8: 808-814
- 37.- Knittel T, Dinfer Ch, Kobold D, et al. Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver. *Am J Pathol*

1999; 154: 153-167

38.-Ramm GA, Nair VG, Bridle KR, et al. Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia *Am J Pathol* 1998; 153: 527-535

39.-Matsuoka M, Pham NT, Tsukamoto H. Differential effects of interleukin-1a, tumor necrosis factor a, and transforming growth factor b1 on cell proliferation and collagen formation by cultured fat-storing cells. *Liver* 1989; 9: 71-78.

40.-Schmitt-Graff A, Kruger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human liver. *Am J Pathol* 1991; 138:1233-1242

41.-Ramadori G, Knittel T, Odenthal M, Schowoglers S, Neubauer K, Meyer zum Buschenfelde KH. Synthesis of cellular fibronectin by rat liver fat-storing (Ito) cells: regulation by cytokines *Gastroenterology* 1992; 103: 1313-1321

42.-Rockey DC, Maher JJ, Jarnagin WR, Gabbiani G, Fridman SL. Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon-gamma *Hepatology* 1992; 16: 776-84