



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Rol de las células dendríticas en la fibrosis
hepática

N° 590

Rodrigo Lloyd

Director de la tesina: Dra. Laura Alaniz
Co-director: Dr. Guillermo Mazzolini

Departamento de Investigaciones
Diciembre 2013

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

Resumen

El hígado cumple funciones metabólicas únicas en el organismo por lo que se lo considera de vital importancia dentro del mismo. Debido a la naturaleza de las funciones que el hígado cumple es un blanco frecuente de injurias causadas por virus o por toxinas, que inducen inflamación y necrosis hepatocitaria. Si estos daños no son controlados la inflamación se torna crónica ocasionando anomalías en la arquitectura tisular, entre ellas depósitos patológicos de componentes de la matriz extracelular. Esta condición se la conoce como fibrosis, siendo el estadio final la cirrosis hepática, que también esta caracterizada por distorsiones en las interacciones célula a células o célula a matriz extra celular, que conducen finalmente a una insuficiencia en la función hepática. En los últimos años se ha demostrado que el proceso de fibrosis hepática puede ser reversible. Se han descrito algunos de los mecanismos involucrados en la regresión siendo uno de estos factores la modulación que ejercen las células dendríticas residentes. Las células dendríticas, dependiendo de su fenotipo y estado de madurez, pueden orquestar una respuesta inmunológica que conduzca a la reducción en la fibrosis. El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de estas células en la fibrosis hepática, contrastar la diferencia que existe entre los fenotipos de células dendríticas maduras e inmaduras, y analizar los distintos factores que intervienen en este proceso. En este estudio se demuestra que las células dendríticas administradas de manera exógena son capaces de disminuir la fibrosis hepática en nuestro modelo murino. Por otro lado pudimos observar que el grado de resolución de fibrosis ocasionado por el tratamiento con las células dendríticas depende en parte de su estado madurativo.

Agradecimientos

A lo largo de todo este año de trabajo hubieron muchas personas involucradas que aportaron tantas cosas como conocimientos, consejos, más trabajo y sobre todo calidez humana. Sin todo esto, este trabajo no hubiera sido posible, por eso deseo agradecer:

- A la Dra. Laura Alaniz quien me dio la oportunidad de trabajar en esta tesina junto a ella y me explicó con paciencia todo lo que necesitaba, y por ser la tutora de este trabajo.
- Al Dr. Guillermo Mazzolini por abrirme las puertas del laboratorio de terapia génica y del mundo de la investigación.
- A todos los integrantes del laboratorio de terapia génica por ser tan buenos compañeros:
- A la Lic. Flavia Piccioni por tanta ayuda experimental y por su aporte intelectual a este trabajo, por enseñarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio.
- Al Lic. Juan Bayo Fina por sus buenos consejos, y por ayudarme en pasos fundamentales de mis experimentos.
- Al Lic. Esteban Fiore por su ayuda incondicional y por darme tanto trabajo.
- Al M.D. Miguel Rizzo por sus consejos oportunos y su indispensable ayuda.
- Al Lic. Estanislao Peixoto por sus consejos en el trabajo, su colaboración desinteresada y su aporte respondiendo dudas y consultas.
- A la Dra. Mariana Malvicini por sus consejos siempre útiles, a la Dra. Mariana García, a la Dra Catalina Atorrasagasti, al Dr. Jorge Aquino, por integrar el grupo y siempre responder alguna de mis consultas.
- A todos los chicos de los laboratorios del 5º piso que siempre colaboraron, a Soledad Arregui por su colaboración técnica.
- A Guillermo Gastón por su ayuda en el bioterio, por cuidar tan bien a mis ratones y por generar tan cordial clima de trabajo.
- A toda mi familia y hermanos en especial mi mamá quien es parte fundamental no solo de este trabajo sino también de toda mi carrera universitaria.

“Todos ustedes saben lo fundamental que fueron en este trabajo.”

Abreviaturas

α -SMA: α actina de musculo liso

AH: ácido hialurónico

AHD: arteria hepática derecha

AHÍ: arteria hepática izquierda

CPA: células presentadoras de antígeno

bHABP: proteína de unión a ácido hialurónico biotinilada

BSA: albumina sérica bovina

CD: células dendríticas (CDi: célula dendrítica inmadura, CDm: célula dendrítica madura)

CEH: células estrelladas hepáticas

CCL4: tetracloruro de carbono

CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo

VC: vena central

DAB: diaminobencidina

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

GAG: glicosaminoglicano

GFP: proteína verde fluorescente

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

IGF-1: factor de crecimiento tipo insulina

IL: interleuquina

INF- γ : interferón gama

LSEC: células endoteliales sinusoidales

LPS: lipopolisacárido

MCP: proteína quimioattractante de monocitos

MEC: matriz extracelular

CMH II: complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II

MMP: metaloproteasa

NASH: esteatohepatitis no alcohólica

NK: células natural killer

AP: área portal

PBS: buffer fosfato salino

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

SFB: suero fetal bovino

TAA: tioacetamida

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante β 1

TIMP: inhibidor tisular de metaloproteasa

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TP: tracto portal

VEGF: factor de crecimiento endotelial y vascular

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VPD: vena porta derecha

VPI: vena porta izquierda

Índice

1. Introducción.....	9
1.1. El hígado	9
1.1.1. Anatomía general	9
1.1.2. Microanatomía	9
1.1.3. Fisiología hepática	11
1.2. Fibrosis hepática	11
1.2.1. Bases moleculares y celulares de la fibrosis: descripción	13
1.2.2. Fibrosis hepática y sistema inmunológico.....	16
1.2.3. Modelos experimentales in vivo de fibrosis hepática	17
1.2.4. Tratamiento de la fibrosis y cirrosis hepática	18
1.3. Células dendríticas	18
1.3.1. Reseña histórica	18
1.3.2. Caracterización y funciones fisiológicas	18
1.3.3. Células dendríticas e hígado: nuevas funciones	20
2. Hipótesis de trabajo	21
3. Objetivos	21
3.1. Objetivos generales	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. Materiales y métodos	21
4.1. Animales	21
4.2. Modelo de fibrosis hepática en ratón con tioacetamida (TAA)	21
4.3. Cultivo de células dendríticas	22
4.4. Transferencia adoptiva de células dendríticas	22
4.5. Patología y cuantificación de fibrosis	22
4.6. Tinciones histológicas	23
4.7. Inmunohistoquímica α -SMA y GFP	23
4.8. Tinción histoquímica para la detección de ácido hialurónico	24
4.9. Medición de interleuquinas en suero mediante ELISA	25
4.10. Análisis fenotípico de células dendríticas por citometría de flujo	25
4.11. Análisis estadístico	26
5. Resultados	26
5.1. Caracterización del fenotipo de las células dendríticas empleadas en la terapia adoptiva	26
5.2. Localización de las CD inoculadas exógenamente en el hígado	27
5.3. Análisis histológico	28
5.4. Efecto terapéutico de las CD sobre la fibrosis	29
5.5. Expresión de α -actina de músculo liso (α -SMA) en tejido hepático	31
5.6. Expresión de ácido hialurónico en tejido hepático	32
5.7. Medición de citoquinas involucradas en la fibrosis hepática.....	33
6. Discusión	35
7. Conclusiones	37
8. Bibliografía	38

1. Introducción

1.1. El hígado

1.1.1. Anatomía general

En un humano adulto promedio el hígado pesa aproximadamente 1,5 kg. Esto hace que sea la víscera de mayor tamaño del organismo y también de gran importancia debido al rol que cumple en el metabolismo general. Está formado por cuatro lóbulos: el lóbulo izquierdo se encuentra extendido sobre el estómago y separado del lóbulo derecho por el ligamento falciforme que une el hígado al diafragma y a la pared anterior del abdomen, y los otros dos lóbulos de menor tamaño, el cuadrado y el caudado que se ubican dorsalmente con respecto a los lóbulos principales, la vesícula biliar se encuentra en la cara inferior del lóbulo derecho [1]. El hígado ocupa una posición estratégica en el abdomen ya que se encuentra entre la circulación esplénica, filtrando la sangre, removiendo y adicionando sustancias a la circulación sistémica. El sistema sanguíneo del hígado está compuesto por la arteria hepática y la vena porta, lo cual genera una doble irrigación [2] (Figura 1). La que proviene de la vena porta que es entre el 65-85% de la irrigación total hepática y drena la sangre desde el tracto intestinal, rica en compuestos y nutrientes absorbidos en la digestión y pobre en oxígeno. El porcentaje restante de sangre total proviene de la arteria hepática y es sangre rica en oxígeno. En los sinusoides hepáticos, que son los espacios entre hepatocitos, se mezcla la sangre que procede de esta doble circulación lo que le permite a los hepatocitos tener acceso a oxígeno, nutrientes y metabolitos necesarios para sintetizar sales biliares, que junto al colesterol, lecitina, iones bicarbonato, pigmentos biliares y agua forman la bilis [3].

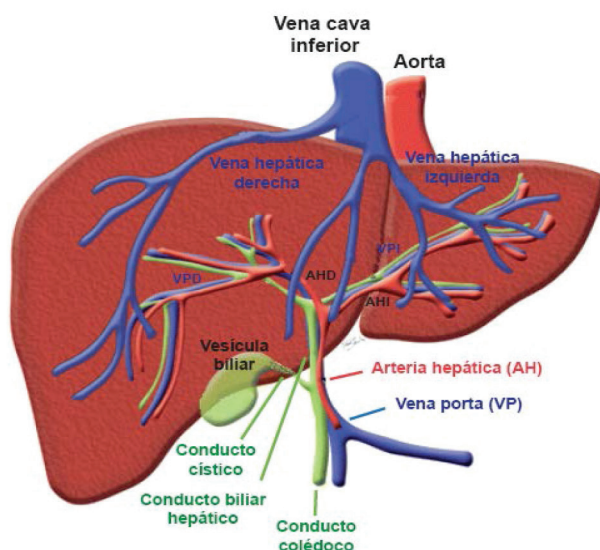


Figura 1: Adaptado de Vascular and Biliary Variants in the Liver: Implications for Liver Surgery. VPD, vena porta derecha; VPI, vena porta izquierda; AHD, arteria hepática derecha; AHI, arteria hepática izquierda [4].

1.1.2. Microanatomía

Microscópicamente el hígado está dividido en estructuras en forma hexagonal, de 1 a 2 mm de diámetro que se orientan alrededor de una vena central: la vena centrolobulillar y a dicha estructura se la denomina lobulillo hepático. Asimismo, esta estructura posee espacios porta en tres de sus vértices, conformado por un conducto biliar, una rama de la arteria hepática y una de la vena porta cuyos vasos se encuentran rodeados por tejido conectivo y fibroblastos. (Figura 2 A y B)[5, 6].

Los hepatocitos, conforman las principales células del parénquima, se disponen en el lobulillo en forma radial desde las venas centrolobulillares, son también los que se encuentran más alejados de la circulación sanguínea arterial y debido a esta condición fisiológica se admite hoy que estos constituyen la periferia

de los lobulillos metabólicos a los que se los llama acinos hepáticos, la unidad funcional hepática. Por lo tanto esta estructura está centrada en el espacio porta y limitado por las venas centrolobulillares en la periferia (Figura 2 C). Los hepatocitos están recorridos por los capilares hepáticos, los sinusoides y el espacio extrasinusoidal. El espacio de Disse, está delimitado por células endoteliales sinusoidales, que son fenestradas y discontinuas y recubren a los sinusoides [6]. Dentro de este espacio, además de proyectarse las microvellosidades hepatocitarias, se encuentran un tipo de células de origen mesenquimal llamadas células estrelladas hepáticas (CEH o células de Ito). Estas células intervienen en el almacenamiento y metabolismo de la vitamina A, además de contener depósitos lipídicos. En caso de inflamación hepática, estas células sufren un proceso de diferenciación que las convierte en células con un fenotipo de tipo miofibroblasto. Esta diferenciación convierte a las CEH en células fundamentales en el proceso fibrogénico hepático por los factores que sintetizan y liberan al espacio extracelular [7].

En la superficie luminal de las células endoteliales sinusoidales se encuentran las células de Kupffer, o macrófagos hepáticos, que forman parte del sistema fagocitario monocítico y conjuntamente con las células endoteliales sinusoidales forman el mayor sistema de remoción de células envejecidas y proteínas de la sangre [8, 9].

Finalmente, se estima que el hígado contiene cerca de 10×10^{10} linfocitos de diferentes fenotipos que se encuentran a lo largo de los sinusoides y tractos portales. Estos incluyen linfocitos T, NK (natural killer o asesinas naturales) y células dendríticas (CD) [5].

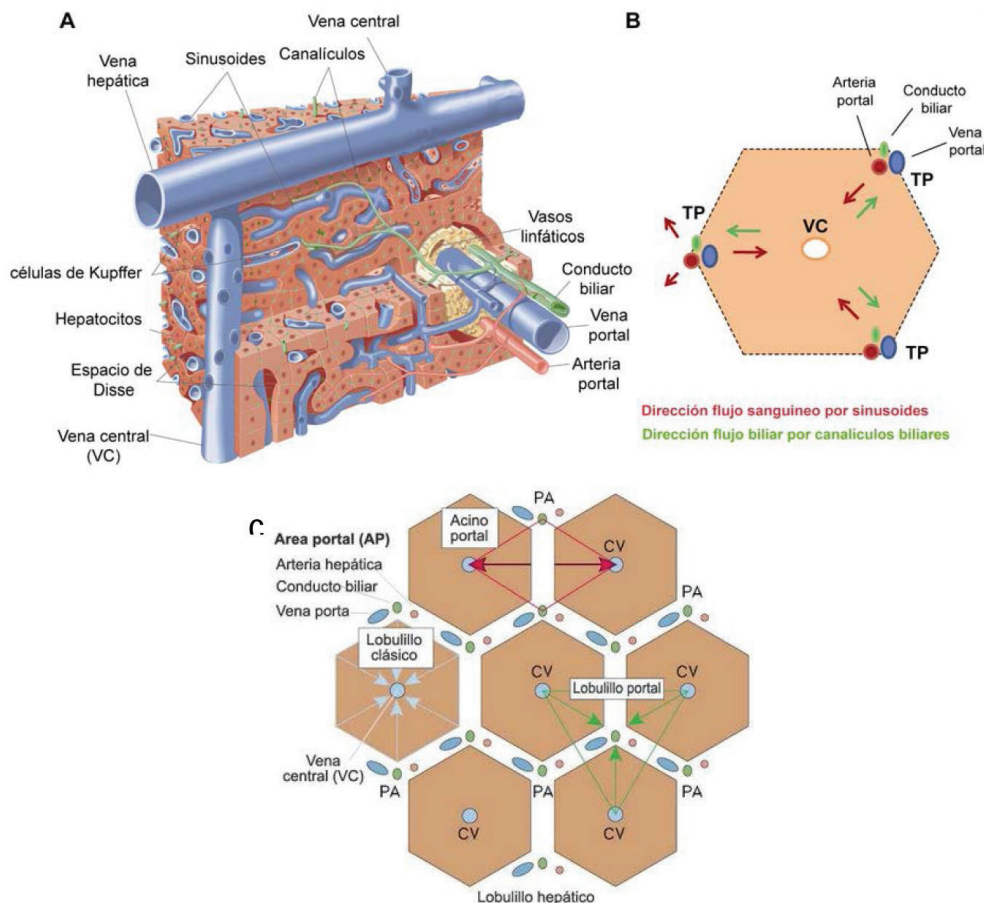


Figura 2: Anatomía e histoarquitectura hepática. A) Representación estructural del tejido hepático. B) Modelo de la unidad estructural hepática, el lobulillo hepático. Las flechas rojas indican el flujo sanguíneo que circula por los sinusoides desde la zona porta hasta la VC. Las flechas verdes muestran la circulación de la bilis desde los hepatocitos que la producen hasta los conductos biliares. TP: tracto porta, VC: vena central. Adaptado de Wallace et al, 2008) [5]. C) Modelo de histoarquitectura hepática, estructura del acino hepático. VC: vena central, AP área porta. Adaptado de Robbins. Patología estructural y funcional. Séptima edición.

1.1.3. Fisiología hepática

El hígado es un órgano en el que ocurren una serie de procesos fundamentales para el organismo como procesos metabólicos de detoxificación, digestivos, homeostáticos, inmunológicos y de reservorio. [Patología estructural y funcional, Robbins y Cotran, Octava edición, Cap. 18, pag. 833]

Funciones metabólicas: el hígado cumple un rol irremplazable en los procesos metabólicos de grasas, proteínas y carbohidratos, y son realizados principalmente por los hepatocitos. Metabolismo de lípidos: puede ser llevado a cabo por casi todas las células del organismo, pero en ciertos aspectos los hepatocitos son especializados. La síntesis y formación de lipoproteínas, metabolismo del colesterol y fosfolípidos, beta-oxidación de ácidos grasos y el almacenamiento de vitaminas, en especial la vitamina A por parte de las CEH.

Metabolismo de proteínas: los hepatocitos son capaces de captar los aminoácidos de la circulación portal provenientes de la alimentación y a través de la transaminación son recompuestos en proteínas estructurales y plasmáticas. También son capaces de llevar a cabo la deaminación de los aminoácidos que componen las proteínas con el fin de utilizarlas como fuente de energía cuando el organismo se encuentra en ayuno. Además, el hígado metaboliza compuestos tóxicos derivados del nitrógeno como el amoníaco, y solo los hepatocitos tienen las enzimas necesarias para a partir de dicho compuesto realizar la síntesis de urea, no tóxica y así excretarlo sin producir daño.

Metabolismo de hidratos de carbono: el hígado es el principal responsable de la homeostasia de los azúcares. Cuando la concentración de glucosa en sangre se incrementa, el hígado remueve el exceso de la misma por la vía de la síntesis de glucógeno y lipogénesis, acumulando energía. Así mismo cuando se produce un descenso de glucosa en sangre, el hígado la produce por la vía de glucólisis y gluconeogénesis.

El hígado forma la bilis en los hepatocitos y la almacena en la vesícula biliar. La bilis es la principal vía de secreción de la bilirrubina y colesterol. Por otra parte, la presencia de sales biliares permite la digestión de las grasas así como su adsorción junto con las vitaminas liposolubles de los alimentos [2].

Dentro de las funciones vasculares, dado el gran tamaño del hígado le permite actuar como reservorio de sangre del organismo ya que es capaz de almacenar el 10% del volumen total de sangre, administrando así el nivel de la volemia en situaciones de hiper o hipovolemia.

También cumple funciones inmunológicas, en este sentido, las células de Kupffer, que recubren los sinusoides hepáticos fagocitan parásitos, virus, bacterias y macromoléculas (como inmunocomplejos y endotoxinas bacterianas) por endocitosis mediada por receptores. Por lo tanto, estas células constituyen una poderosa e importante barrera fagocítica para toxinas y microorganismos provenientes del intestino [10]. También en el hígado sano se encuentra un gran número de células Natural Killer, en menor proporción células dendríticas, mastocitos y, en muy baja proporción, granulocitos [Inmunología celular y molecular, Abbas A.K., Sexta edición] Por otro lado, el hígado sintetiza proteínas de fase aguda (como proteína C reactiva), componentes del complemento y citoquinas, que forman parte del sistema inmune innato. Así mismo residen también linfocitos B y T en el tejido hepático, como componentes del sistema inmune adaptativo [Inmunología celular y molecular, Abbas A.K., Sexta edición]

1.2. Fibrosis hepática

Numerosos estudios dan cuenta de la gran capacidad del hígado para regenerar su parénquima en respuesta a distintos tipos de daño. De hecho es capaz de recuperar su tamaño normal tras pérdidas de hasta un 70% del total de su parénquima [8].

Ante un daño temporal seguido de inflamación (como por ejemplo la hepatopatía por infección con virus de la hepatitis B o C y la hepatopatía por ingesta excesiva de alcohol) se produce remodelación de la estructura hepática, acumulación de depósitos de colágeno y otras moléculas de la matriz extracelular (MEC), producido por la necrosis de hepatocitos; en segunda instancia, este proceso es compensado por mecanismos de fibrinólisis que degradan esta matriz [11, 12]. El proceso de fibrosis tiene como objeto detener el daño ante la agresión externa, sin embargo, si el agente causante persiste, la fibrogénesis pasa a tener un rol deletéreo y causa la acumulación de proteínas y distintos componentes de la MEC, alterando la arquitectura tisular. Se reconoce en la actualidad que la fibrogénesis es el resultado de un proceso activo de cicatrización continuo [8].

La evolución de la fibrosis hepática es por lo general un proceso lento y progresivo cuyas características dependen de los factores que la causan, ya sea por factores genéticos, de comportamiento o

del agente que ocasionó la injuria e inflamación (Tabla 1). Los cambios en la microarquitectura hepática mencionados gradualmente ocasionan una disfunción general, resistencia intrahepática al flujo sanguíneo, hipertensión portal, alteraciones en las funciones metabólicas y apoptosis de hepatocitos, procesos que pueden culminar en el estadio final que es la cirrosis hepática [13-15] (Figura 3).

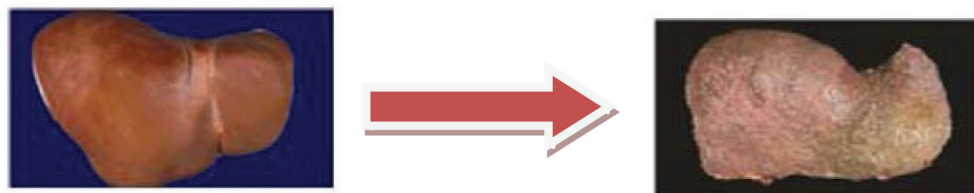


Figura 3: Progresión de un hígado humano normal a un hígado con fibrosis avanzada o cirrosis. Adaptado de Wallace, 2008 [5].

Etiología	Factores Moleculares y genéticos	Factores no genéticos
Hepatitis por VHC (virus de la hepatitis C)	Angiotensinógeno TGF- β 1 TNF- α Apolipoproteína E Hidrolasa epóxido microsomal MCP-1 MCP-2 Factor de la coagulación V	Edad Sexo Consumo de alcohol Coinfección con VIH o VHB Trasplante hepático No respuesta al tratamiento Obesidad
Enfermedad Hepática alcohólica	IL-10 IL-1 β Alcohol deshidrogenasa Aldehído deshidrogenasa Citocromo P450 2E1 TNF- α	Edad Sexo Consumo de alcohol Episodio de hepatitis alcohólica
NASH (esteatohepatitis no alcohólica)	Gen de la hemocromatosis hereditaria Angiotensinógeno TGF- β 1	Edad Obesidad
Cirrosis biliar primaria	IL-1 β TNF- α Apolipoproteína E	

Tabla 1: Factores y causas; genéticas o moleculares y no genéticas que influyen en inicio y la progresión de la fibrosis hepática; adaptado de Moreno Sánchez, 2009 [8].

1.2.1. Bases moleculares y celulares de la fibrosis: descripción

Como ya se mencionó anteriormente, la fibrosis hepática implica el aumento en el depósito de componentes de la MEC como colágeno, elastina, glicoproteínas estructurales, proteoglicanos y ácido hialurónico. Inicialmente se acumula en las zonas perisinusoidales (espacios de Disse) extendiéndose luego a las zonas pericentrales o periportales. Al continuo incremento de MEC se le suma una disminución en los procesos fisiológicos de degradación de la misma y como consecuencia aumenta la dificultad del paso de nutrientes y solutos vitales desde el sinusoides hasta el hepatocito, conduciendo la muerte de los mismos (Figura 4).

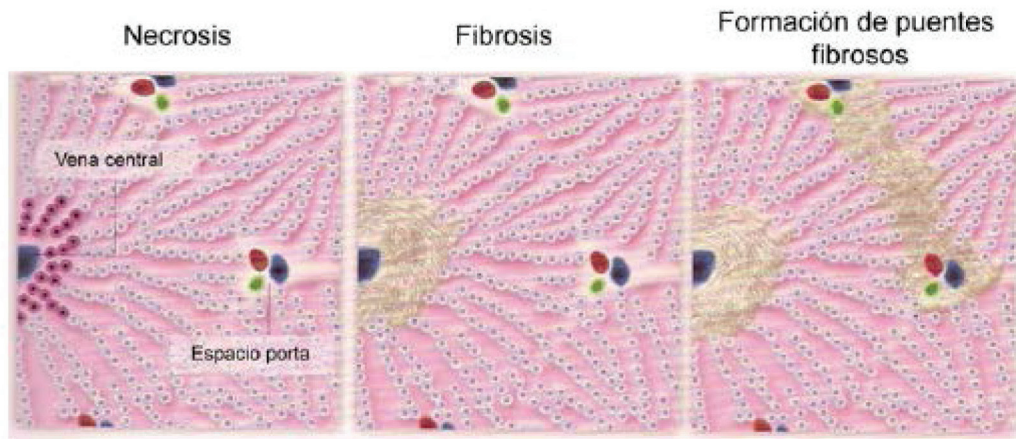


Figura 4: Desarrollo de fibrosis hepática. Esquema secuencial de daño en la región pericentral. Necrosis de hepatocitos (violeta), depósitos en la MEC que forman una cicatriz y formación de septos o puentes fibrosos. Adaptado de Atlas de cirrosis y cáncer hepático, fascículo 3, Bristol&Myers Squib.

La necrosis de los hepatocitos induce el reclutamiento de células inflamatorias, otro evento importante en el desarrollo de la fibrosis. Este proceso inflamatorio también ocasiona remodelación tisular y distorsión en la microarquitectura hepática.

En condiciones fisiológicas las CEH que se encuentran en forma quiescente. Se encargan de la regulación y el recambio de la MEC, de almacenamiento de vitamina A y de secretar citoquinas y factores de crecimiento que contribuyen a la homeostasis de la MEC. Pero en situación de injuria existen factores que activan a las CEH y las mismas adquieren un fenotipo de miofibroblasto caracterizado por tener una elevada capacidad proliferativa, sintética y contráctil. Por lo que se considera que juegan un rol fundamental en el desarrollo de la fibrosis hepática [16, 17] (Figura 5).

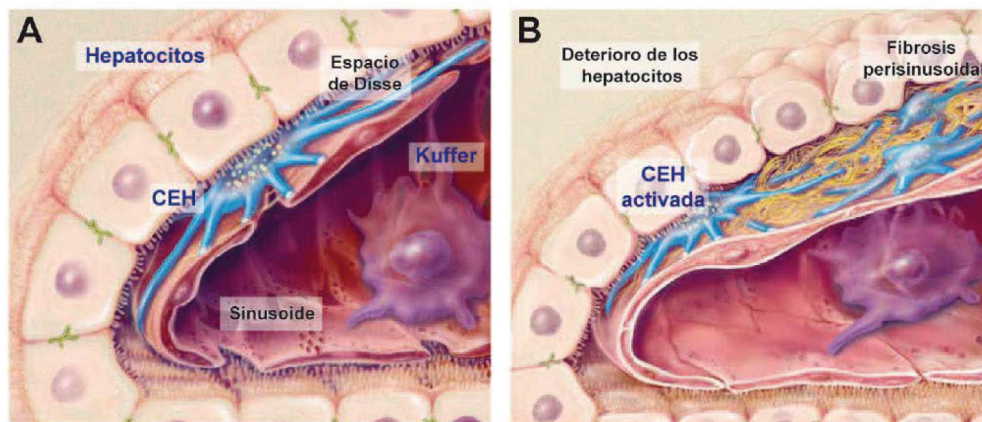


Figura 5: Cambios en el espacio extrasinusoidal durante la fibrosis. A) microarquitectura normal con la presencia de CEH quiescentes (azul). B) en fibrosis hepática se observa acumulación de la MEC en el espacio de Disse y modificación de las CEH activadas. Adaptado de Friedman, 2003 [18].

Las CEH se caracterizan por expresar proteínas del citoesqueleto como la alfa actina de musculo liso (α -SMA) y filamentos intermedios de colágeno de clase III. Como ya se describió anteriormente, las CEH se encargan de sintetizar las proteínas de la MEC en el hígado; su rol en el proceso de fibrogenesis es fundamental porque al pasar de un fenotipo quiescente a un fenotipo activado aumenta significativamente la síntesis de colágeno tipo I y III [19, 20]. En la fibrosis existe además de un cambio cuantitativo en la composición de la MEC, que normalmente está compuesta por colágeno tipo I, III, IV, V, VII y por componentes como glicoproteínas (por ej. fibronectina, laminina), proteoglicanos sulfatados [21-23]. En cambio, durante el proceso de fibrogénesis la matriz aumenta de 3 a 5 veces y pasa a tener una composición más densa, fundamentalmente por la presencia de colágeno tipo I y III; fenómeno que se ve favorecido por la alteración de la actividad de unas de las principales enzimas remodeladoras de la MEC como lo son las metaloproteasas (MMP), encargadas de la degradación de colágeno y demás componentes de la MEC. Se sabe que las CEH en un estado normal son las encargadas de sintetizar MMP-2 y MMP-3 mientras que las células de Kupffer son las encargadas de sintetizar MMP-9. Tanto la MMP-2, MMP-3 y MMP-9 son responsables de la degradación de la matriz de baja densidad, mientras que la MMP-1 se encarga de la degradación de colágeno y de matriz de alta densidad [24-26]. Cuando las CEH se encuentran activadas aumentan la expresión de TIMP-1 y TIMP-2 que son inhibidores de las MMPs, lo cual genera un desbalance en el grado de activación de las MMPs con el consecuente cambio en la composición de la MEC y la acumulación de colágeno en el proceso de fibrosis [27, 28].

Por otra parte, numerosas citoquinas y factores de crecimiento son secretados por los diversos tipos celulares presentes en el hígado fibrótico, regulando de esta manera el proceso fibrogénico. Más aún, dichos factores son capaces de alterar la respuesta inmune frente al daño al modular a las distintas células inflamatorias reclutadas durante la fibrogénesis. Por ejemplo, citoquinas quimioattractantes son capaces de reclutar neutrófilos y monocitos, los cuales amplifican la inflamación ocasionada por la lesión. Teniendo en cuenta las causas y los estadios de la fibrosis, las citoquinas involucradas se describen en la tabla 2, y los eventos se detallan en la figura 6 y 7.

Grupo	Mediador	Efecto
Citoquinas	MCP-1	Profibrogénico [29]
	RANTES	Profibrogénico [30]
	IL-1	Profibrogénico [31]
	IL-6	Profibrogénico [8]
	IL-10	Antifibrogénico [32]
	INF- γ	Antifibrogénico [33]
Factores de crecimiento	TGF- β	Profibrogénico [34]
	PDGF	Profibrogénico [35]
	CTGF	Profibrogénico [36]
	VEGF	Profibrogénico [37]
	FGF 1 y 2	Profibrogénico [38]
	HGF	Antifibrogénico [39]
	IGF-1	Antifibrogénico [40]

Tabla 2: Efecto en la fibrosis de factores de crecimiento y citoquinas.

Como se indica en la Tabla 2 hay factores que favorecen el desarrollo de la fibrosis, como la angiogénesis, que es a su vez modulada principalmente por moléculas como el VEGF. Distintos antecedentes de la bibliografía muestran que existe una correlación entre el incremento de la fibrosis y el incremento de la angiogénesis [37]. Resulta fundamental la presencia de factores pro-angiogénicos como el VEGF, que a su vez se sabe que distintos tipos celulares como las CD son capaces de secretarlo [41]. Otro factor fundamental es TGF- β , que en el proceso de inflamación es secretado por hepatocitos dañados,

favoreciendo el entorno de inflamación, reclutamiento de linfocitos T y estimulando la activación de CEH que a su vez, una vez activadas perpetúan la síntesis y secreción de TGF-β [34].

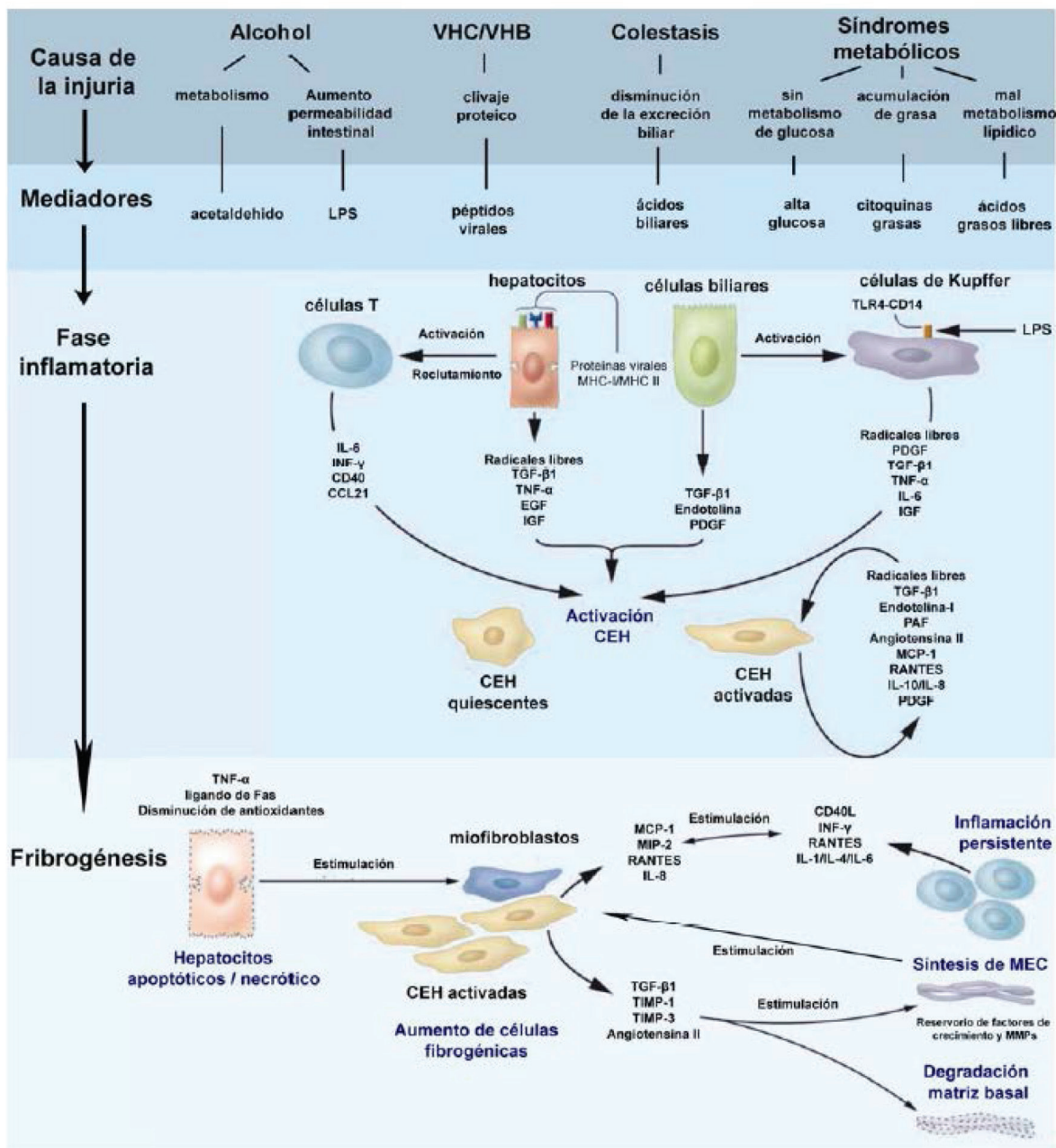


Figura 6: Mecanismos celulares involucrados en la fibrosis hepática: diferentes noxas pueden causar injuria hepática. La liberación de factores y citoquinas por parte de hepatocitos dañados producen la activación de las células de Kupffer y estimulan el reclutamiento de linfocitos generando un microambiente que promueve la activación de las CEH, estas a su vez producen citoquinas que perpetúan su activación y aumento de componentes de la MEC, lo que induce la muerte por necrosis y/o apoptosis de hepatocitos, perpetuando la activación de las CEH. Adaptado de Bataller et al 2005 [8].

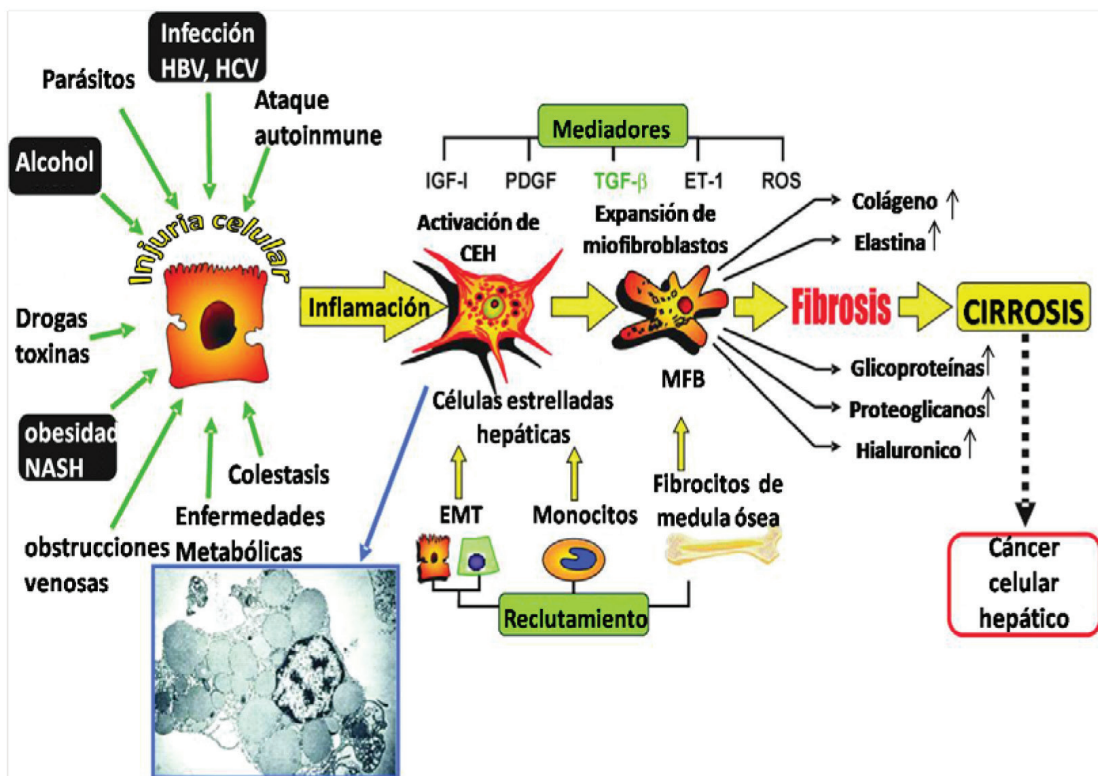


Figura 7: Esquema del proceso de fibrogénesis que muestra el progreso desde la injuria celular hasta la cirrosis hepática, principal causa de cáncer primario de hígado. Adaptado de Gressner et. al[42].

1.2.2. Fibrosis hepática y sistema inmunológico

Las funciones fisiológicas que desarrolla el hígado como remover antígenos y patógenos de la sangre, síntesis de ciertas proteínas, participación en procesos metabólicos fundamentales para el organismo, entre otros, requieren de una respuesta inmune que este adaptada a estas tareas y sea regulada localmente. Es por eso que los microorganismos patógenos deben ser eliminados eficientemente mientras que el gran número de antígenos derivados del tracto gastrointestinal no deben generar respuesta inmune por lo cual son tolerados [10].

Los hepatocitos que constituyen la mayor población celular en el hígado no interactúan directamente con los leucocitos circulantes en sangre, las células endoteliales sinusoidales separan a los hepatocitos de los leucocitos y células de Kupffer[18]. En el momento en el cual se desencadena un proceso que lleva a la muerte de hepatocitos y a una injuria hepática, se produce una ruptura en la homeostasis en la cual las células endoteliales sinusoidales permiten el ingreso de células del sistema inmune para combatir el daño que ocasionó la inflamación. El sistema inmune es capaz de resolver la inflamación y eventualmente recuperar la homeostasis del órgano. Sin embargo, si la injuria persiste al cronificarse se impide esta reparación fisiológica y la respuesta se vuelve patológica. En dicho caso la injuria produciría una inflamación inicial que no sería resuelta por las células del sistema inmune, esto llevaría a una mayor activación de las CEH que estarían constantemente sintetizando y depositando proteínas de la MEC en remplazo de los hepatocitos muertos y todos estos factores combinados promueven una mayor atracción de células del sistema inmune, como macrófagos, que contribuirían a una inflamación crónica y el proceso patológico de fibrosis hepática se puede desarrollar hasta convertirse en cirrosis [5]. Sin embargo, algunas células del sistema inmune como las CD pueden estar contribuyendo positivamente a la resolución de la fibrosis hepática, debido a la capacidad que tienen para: I) regular el perfil de la respuesta inmune II) Activar células como las NK que actúen induciendo la muerte de las CEH activadas III) secretar citoquinas que resulten antifibróticas y VI) secretar proteínas que degraden la MEC acumulada [43].

1.2.3. Modelos experimentales in vivo de fibrosis hepática

En el estudio de la fibrosis hepática los modelos animales son fundamentales para estudiar el progreso de la enfermedad y los factores involucrados. También son útiles para ensayar distintas drogas o terapias antifibróticas. En estos modelos se pueden estudiar el papel que cumplen las células involucradas en la fibrosis como las CEH, las células de Kupffer, las células endoteliales sinusoidales o como en los experimentos desarrollados en esta tesina, las células del sistema inmune tales como las células dendríticas.

Se usan ratones como modelo animal, por su homología con el ser humano y la facilidad relativa para tener ratones transgénicos y *knockouts* (Tabla 3).

Agente hepatotóxico (dosis standard)	Modelo animal	Mecanismo principal de daño	Hallazgos histológicos asociados	Caracterización de la fibrosis
CCl ₄ : 1ml/kg i.p. dos veces por semana durante 4 a 12 semanas	Rata, ratón	Peroxidación lipídica	Necrosis de hepatocitos centrolobulillares	Pericentral con puentes centro-centrales
Tioacetamida: 200mg/kg i.p. tres veces por semana durante 8 a 12 semanas	Rata, ratón	Generación de especies de tioacetamida sulfóxido que produce uniones no covalentes a células	Necrosis de hepatocitos centrolobulillares	Pericentral con puentes centro-centrales
Ligadura del conducto colédoco: 2 a 3 semanas luego de la intervención quirúrgica	Rata, ratón	Acumulación de ácido biliar que estimula apoptosis y disrupción de la membrana celular	Necrosis periportal	Periportal y formación de puentes

Tabla 3: modelos in vivo de fibrosis hepática. Adaptado de Wallace, 2008.

El modelo empleado en esta tesina es el modelo de fibrosis inducido por administración intraperitoneal de tioacetamida (TAA). La TAA es un potente hepatotóxico que debe ser bioactivado por citocromo P450 o sino por el sistema monooxigenasa conteniendo-flavina (FMO) que lo convierten en tioacetamida sulfóxido capaz de generar necrosis centrolobulillar, generando cambios en la permeabilidad celular, incrementando las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ e inhibiendo la actividad mitocondrial [44, 45].

1.2.4. Tratamiento de la fibrosis y cirrosis hepática

En la actualidad no existen tratamientos establecidos para la fibrosis y la cirrosis hepática. Por otra parte, hasta hace algunos años atrás se pensaba que la fibrosis era irreversible y que llevaba irremediablemente a cirrosis hepática, pero estudios actuales demuestran que la fibrosis es un proceso reversible en sus estadios tempranos y ante el cese del factor que causa la injuria. Actualmente el único tratamiento para la fibrosis avanzada y la cirrosis es el trasplante hepático, que no solo es un proceso costoso sino que enfrenta una problemática limitante debido a la escasez de donantes. Por lo que resulta de mucha importancia seguir trabajando en la investigación de nuevas estrategias terapéuticas y nuevos tratamientos que permitan detener la progresión de la cirrosis o contribuir a su resolución.

1.3. Células dendríticas

1.3.1. Reseña histórica

Las células dendríticas (CD) fueron descritas por primera vez por el científico alemán Paul Langerhans al haberlas observado en el tejido epitelial empleando una tinción con cloruro de oro, sin embargo no fue capaz de explicar la función que cumplían estas células. Posteriormente fue propuesta la teoría de la selección clonal que explicaba que los linfocitos solo respondían al estímulo de un antígeno si estos son compatibles con sus receptores, sin embargo, no se lograba establecer una interacción entre los linfocitos y el antígeno si eran enfrentados *in vitro* [Langerhans, P año 1868].

Años más tarde en 1973 el científico Ralph Steinman fue quien describió a las células dendríticas como nexos entre los linfocitos y la presentación antigénica; dicho descubrimiento modificaba el paradigma de la época y por lo tanto no había sido aceptado por la comunidad científica. Ante esta situación, Steinman continuó realizando sus investigaciones en CD y logró establecer el concepto de célula dendrítica como célula presentadora de antígeno y es por sus logros que hoy se lo considera a Steinman como el padre de las células dendríticas y galardonado con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en el 2011 [46].

1.3.2. Caracterización y funciones fisiológicas

Las células presentadoras de antígenos (CPA) constituyen una población celular especializada en la captura antigénica, su exhibición a los linfocitos y la transmisión de señales que estimulan su proliferación y diferenciación. Cumplen una función de vínculo entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa y por lo tanto son consideradas como un componente de ambos sistemas, entre esta población de CPA se encuentran los macrófagos, linfocitos B y células dendríticas [47].

Las CPA tienen dos funciones importantes: la primera es el procesamiento antigénico, que es la captura de un antígeno extraño, por distintos mecanismos de endocitosis, el mismo al ser fagocitado en el interior de la célula es degradado, similarmente antígenos endógenos que son degradados a nivel lisosomal luego ser procesados. La segunda función es la presentación antigénica que se basa en la exhibición de los antígenos extraños a linfocitos T mediante el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I y II (MHC II), siendo la expresión esta última molécula característica e identificadora a las CPA profesionales [48].

Entre las CPA se destacan las células dendríticas (CD) que cumplen un rol único en la inmunidad debido a la capacidad de modular la respuesta inmune. Estas células derivan de precursores situados en la médula ósea, y que se diferencian o subdividen clásicamente en dos grupos de acuerdo con la expresión de marcadores de superficie: a) las CD mieloides o "clásicas" expresan el marcador CD11c y marcadores mieloides como CD11b, CD13 y CD33 y requieren GM-CSF para desarrollarse, proliferar, diferenciarse y sobrevivir. Estas células pueden inducir la diferenciación de los linfocitos T (LT) hacia células efectoras T colaboradoras o helper (LTh1) que producen INF- γ , b) las CD plasmocitoides, son CD11c⁻, expresan el receptor de la cadena α de IL-3 (CD123) y requieren IL-3 para sobrevivir. Las CD plasmocitoides son productoras de INF tipo I e inducen la respuesta T anti-viral [49]. Por otro lado existe otro subconjunto de CD, que expresan marcadores mieloides, siendo además CD8 α^+ en ratones, productoras de IL-12, capaces de inducir la respuesta inmune celular, con activación de linfocitos T CD8⁺. Existen también CD especiales que cumplen su función en el tejido epitelial; estas se conocen como células de Langerhans. [Inmunología celular y molecular sexta edición, Abbas A.K, cap. 6, pag. 113].

Otra forma de clasificar a las CD se basa en su grado de maduración: las células dendríticas inmaduras (CDi) cuya función principal es la de registrar el entorno en el cual se encuentra y captar antígenos en los

órganos y tejidos periféricos, mediante fagocitosis. Y las células dendríticas maduras (CDm) cuya principal función es la de presentar antígenos. Cuando la CDi reconoce un antígeno o y lo captura, desencadena un evento clave en la presentación antigénica, la CDi procesa el antígeno en el interior para expresarlo como péptido dentro del marco del CMH II lo cual conlleva a que la CDi tenga que modificar su fenotipo de célula inmadura con mayor capacidad fagocítica, a célula madura con capacidad estimuladora. En el transcurso de este proceso, la CD migra a los tejidos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos, en esos tejidos se producirá el encuentro con los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y la presentación antigénica a los mismos [Inmunología celular y molecular sexta edición, Abbas A.K, cap. 6, pag. 113] (Figura 8).

Las CDi expresan en baja proporción las molécula de MHC II, así como moléculas de coestimulo: CD80, CD86 y CD40, que intervienen en proceso de presentación. A diferencia de las CDm que pierden capacidad fagocítica, adquieren prolongaciones en la membrana para aumentar la superficie de contacto y obtienen una mayor capacidad de presentación ya que incrementan la expresión de MHC II, y de CD40, CD80, CD86. Además de los estímulos producidos por el encuentro con el antígeno, la maduración de las CD depende también de las citoquinas involucradas en el proceso inflamatorio, estas citoquinas y factores determinan el fenotipo de la CDm que a su vez establece el tipo de respuesta inmune ya sea Th1, Th2 o Treg [50].

Otra característica correspondiente a las CDi es la expresión del receptor de CCL21 y CCL19 que es el CCR7, principal encargado de mediar la migración de las CD a órganos linfoides secundarios [51].

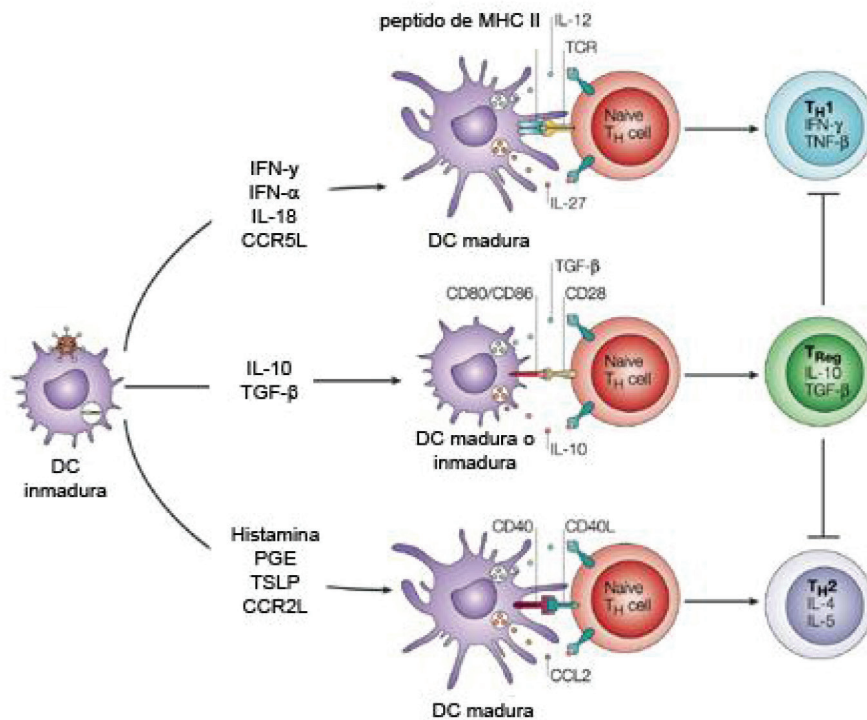


Figura 8: Esquema de funciones de las CD, detallando la diferencia entre CD maduras y CD inmaduras. Adaptado de Kapsenberg 2003 [51].

Existen actualmente técnicas de cultivo in vitro, que permiten trabajar e investigar con las CD. Es posible la obtención de CD humanas extrayendo precursores derivados de sangre periférica o realizando cultivos de médula ósea. En ratones solo se pueden obtener cultivando precursores derivados de médula ósea, si bien es necesario contar con medios adecuados y citoquinas para estimular la diferenciación a CD. Como es el caso de GM-CSF para CD murinas o de GM-CSF e IL-4 en el caso de CD humanas. A su vez, es posible trabajar con células de fenotipo madura, se puede estimular la maduración tanto de CD humanas como CD murinas, mediante el cultivo con distintas moléculas. LPS (lipopolisacárido bacteriano) o poly I:C (polisacárido de tipo sintético), entre otros factores (Figura 9).

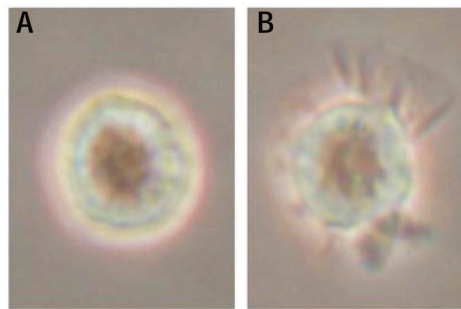


Figura 9: Morfología de CD murinas en cultivo. A) CD inmadura a día 4 de cultivo. B) CD madura a día 7 de cultivo. Adaptado de Sato 2009.

1.3.3. Células dendríticas e hígado: nuevas funciones

Actualmente está bien establecido que la función por excelencia de las CD es la presentación antigénica a los LT. Sin embargo, también cumplen funciones en la activación de otros tipos celulares como las NK. En la fibrosis hepática un evento importante en la resolución es el recambio y eliminación de CEH activadas, y se sabe que las células NK en parte se encargan de inducir la apoptosis de las mismas. Las CD en el hígado inflamado inducen la activación de las NK e intervienen indirectamente en dicho proceso [52].

Otra importante función de las CD es la de regular el proceso inflamatorio dentro del hígado, esto lo logran debido a la secreción de citoquinas que esta determinada por el fenotipo que estas células poseen. Las CD son una potente fuente de citoquinas y quemocinas que resultan ser antifibróticas como (IL-10) y a su vez inhiben la síntesis de otras citoquinas profibróticas (como IL-6) [8].

Recientemente se produjeron nuevos avances que llevaron a sugerir que las CD están directamente involucradas en la degradación de la matriz extra celular debido son la principal fuente de MMP-9, entre otras MMPs [53] (Figura 10).

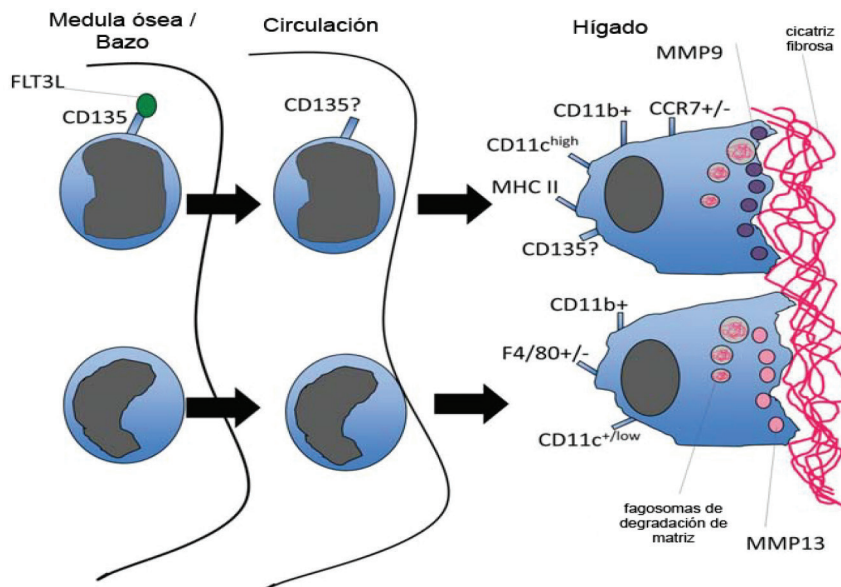


Figura 10: imagen ilustrativa de las células mieloides, entre ellas las CD, reclutadas producto de la inflamación en la cicatriz fibrosa y la acción que cumplen degradando la matriz extra celular acumulada. Adaptado de Duffield 2011 [54].

2. Hipótesis de trabajo

Distintos y recientes antecedentes científicos indican que las células dendríticas cumplen un papel fundamental en la resolución de la fibrosis hepática experimental ante el cese del estímulo fibrogénico. Las células dendríticas, ya sea por las citoquinas que liberan como por la expresión de metaloproteasas, podrían tener efectos también durante el proceso de fibrogénesis hepática. Se sugeriría que de acuerdo al fenotipo y estado de madurez de las mismas el efecto que ejercerían sería diferencial. La hipótesis de este trabajo es que la inoculación exógena de CD podría modular la progresión de la fibrosis hepática inducida por administración crónica de TAA. Más aún, se espera encontrar que de acuerdo al estado madurativo de las CD inoculadas tengan efectos anti o pro-fibrogenicos. Nos proponemos estudiar el efecto que ejercen estas células inoculadas según su estado de maduración en la fibrosis hepática.

3. Objetivos

3.1. Objetivos generales

Conociendo la participación que tienen las CD en la respuesta inmune a nivel hepático y considerando la falta de opciones terapéuticas en la cirrosis hepática, se establece como objetivo de la presente tesina estudiar el papel de las CD inoculadas exógenamente en la fibrosis hepática experimental y analizar los factores y parámetros involucrados en el progreso de la enfermedad que puedan ser modificados por esta terapia. Con el fin último de establecer las pautas para su aplicación como terapia celular en la fibrosis hepática.

3.2. Objetivos específicos

- Generar un modelo murino de fibrosis hepática en estadio temprano, mediante la inoculación de TAA por vía intraperitoneal.
- Generar una población de células dendríticas partiendo de un cultivo primario de médula ósea de ratones; analizar el fenotipo de los distintos cultivos de CD inmaduras y maduras.
- Realizar la transferencia adoptiva de CD singénicas a ratones con fibrosis hepática
- Caracterizar el efecto de la terapia con células dendríticas sobre la fibrosis hepática.
- Establecer los posibles mecanismos o procesos biológicos y celulares que se generan durante la fibrosis hepática y tras la administración de las células dendríticas.

4. Materiales y métodos

4.1. Animales

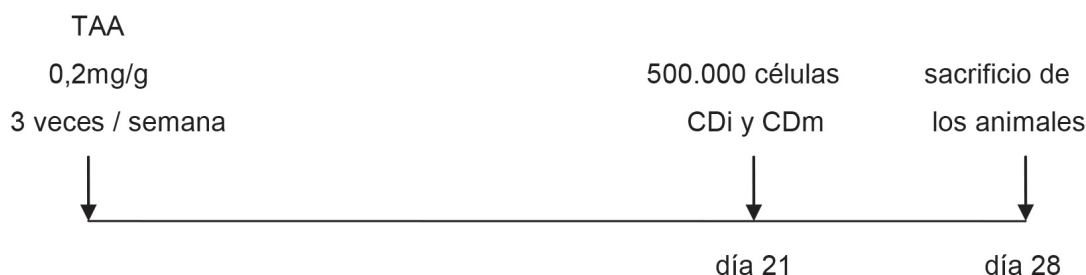
Ratones de la cepa C57BL/6 de 6 a 8 semanas de vida y ratones C57BL/6 transgénicos que expresan la proteína verde de fluorescencia (GFP) fueron mantenidos en el bioterio de la facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral y fueron manipulados de acuerdo al comité de ética experimental, a las normas de bioética del NIH y a las normas indicadas en la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" (National Academy Press, Washington, D.C. 1996).

Los animales fueron alojados en jaulas de 15 individuos, sometidos a un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas de duración, a una temperatura y humedad constantes. Recibieron alimento balanceado y agua *ad libitum*.

4.2. Modelo de fibrosis hepática en ratón con tioacetamida (TAA)

La fibrosis hepática fue inducida mediante la inyección intraperitoneal de TAA a una dosis de 0,2mg/g de animal, tres veces por semana, durante 28 días (4 semanas); a los 21 días, se inocularon las CD (de-

rivadas de medula ósea y obtenidas mediante cultivo celular) vía intravenosa, y a los 28 días los ratones fueron sacrificados y se tomaron muestras de sangre y de tejido hepático.



Esquema de inoculación de TAA y tratamiento realizado.

4.3. Cultivo de células dendríticas

El cultivo de células dendríticas se realizó en esterilidad y se siguió el siguiente protocolo: en primer lugar se sacrificaron ratones C57BL/6 transgénicos para la proteína GFP, se extrajeron tibias y fémures en solución fisiológica. En condiciones de esterilidad se separaron los huesos del tejido muscular y de los restos de grasa. Posteriormente, se cortaron las epífisis de cada hueso y con una jeringa se hizo pasar medio RPMI para extraer la medula ósea, se filtró la suspensión celular por mesh y se centrifugó (900 g durante 5 minutos). Luego se realizó la lisis de los glóbulos rojos agregando 5ml de buffer ACK lisis durante 5 minutos y se centrifugó nuevamente (900 g). Las células se contaron y se sembraron (1×10^6 células/ml) en medio RPMI, SFB 10% y GM-CSF. (20ng/ml, PeProtech) en placas p100. En el 3er día se realizó el cambio de medio descartando el sobrenadante del cultivo y agregando nuevo medio (medio ya descrito anteriormente), los precursores de CD se encuentran creciendo adheridos a este momento del cultivo.

Al día 5 se realizó un nuevo cambio de medio pero en esta ocasión se recolectó el sobrenadante y se centrifugó, ya que las CD se encuentran creciendo en suspensión. Las mismas se resuspendieron en medio y se cultivaron nuevamente hasta el día 7. En el día 7 se trataron con lipopolisacárido (LPS 8 μ l/3 ml de cultivo, Sigma) con el fin de obtener el estímulo para madurar las CD. Al día siguiente las células se cosecharon y se utilizaron para tratamiento o caracterización fenotípica. Estas son denominadas CD maduras (CDm); las CD consideradas como inmaduras (CDi) fueron aquellas que no recibieron tratamiento de LPS.

4.4. Transferencia adoptiva de células dendríticas

A la tercera semana de tratamiento con TAA los animales fueron inoculados por vía intravenosa (vena de la cola) con CD, obtenidas según lo descrito anteriormente, suspendidas en solución fisiológica (500.000 células en 100 μ l).

4.5. Patología y cuantificación de fibrosis

Las muestras de hígado fijadas en formol 10% e incluidas en parafina. Posteriormente fueron cortados en micrótomos con un espesor de 5 μ m y fueron utilizados para realizar las siguientes tinciones: tricrómico de Masson, rojo Sirio y hematoxilina y eosina; inmunohistoquímica de α -actina de músculo liso, GFP y tinción histoquímica para la detección de ácido hialurónico. Los preparados histológicos se observaron y se analizaron con el objetivo de establecer el grado de fibrosis y se empleó el sistema de escala de Ishak para la valoración de la actividad necroinflamatoria y el grado de fibrosis (tabla 4) [55].

Cortes teñidos con rojo Sirio e inmunohistoquímica para detección de α -SMA fueron semicuantificados mediante medición de área empleando el software Image J.

Modificación	clasificación
Sin fibrosis	0
Expansión fibrótica de algunas áreas portales, con o sin septos fibróticos cortos.	1
Expansión fibrótica de la mayoría de las áreas portales, con o sin septos fibróticos cortos.	2
Expansión fibrótica de la mayoría de áreas portales con puente porta-porta (P-P) ocasionales.	3
Expansión fibrótica de áreas portales con puentes marcados (P-P) y porta-central (P-C).	4
Puentes marcados (P-P y/o P-C) con nódulos ocasionales (cirrosis).	5
Cirrosis posible o definitiva.	6

Tabla 4: Score de Ishak para los estadios de fibrosis, clasificación máxima posible: 6.

4.6. Tinciones histológicas

Previo a realizar las distintas tinciones se procedió a desparafinizar el tejido en estufa a 60°C durante 20 minutos y dos pasajes de 10 minutos cada uno en xilol. Luego se hidrató el mismo en alcoholes decrecientes, realizando dos incubaciones de 1 minuto en alcohol 100%, dos incubaciones de 1 minuto en alcohol 96%, dos incubaciones de 1 minuto en alcohol 70%, y dos incubaciones de 5 minutos en PBS.

Hematoxilina & eosina: luego de la hidratación del tejido se incubó el mismo 5 minutos en agua destilada. Se incubó con una solución de hematoxilina por 40 segundos. Se lavó con agua corriente durante 3 minutos. Para deshidratar el tejido se realizaron pasajes en alcoholes crecientes, 70% y 96% durante 5 segundos. Se incubó con solución de eosina durante 5 minutos. Se deshidrató en alcohol pasajes en alcohol 70% y en alcohol 96% por unos 5 segundos, 2 pasajes de 30 segundos en alcohol 100% y 2 pasajes en xilol de 1 minuto y se montó con bálsamo de Canadá.

Rojo sirio: luego de la hidratación del tejido se realizó una incubación de 1 hora con el colorante rojo sirio (rojo sirio 0,1 % m/v; Sigma Aldrich 365548 en ácido pícrico saturado). Se realizaron 2 lavados en agua acidificada (ácido acético glacial al 0,005% en agua destilada). Luego se deshidrató mediante tres pasajes de 1 minuto en etanol 100%. Se aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá.

Tricrómico de Masson: luego de la hidratación del tejido se realizó una incubación de 10 minutos con hematoxilina férrica de Weigert (50% de hematoxilina alcohólica y 50% de cloruro férrico) posteriormente se realizó un lavado con agua corriente de 10 minutos, y luego una incubación de 1 minuto en agua destilada. Se incubó 15 minutos con fucsina acida y se realizó un lavado de 1 minuto en agua destilada. Para la diferenciación se realizó una incubación de 15 minutos con ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (2,5g de ácido fosfotúngstico, 2,5g de ácido fosfomolibdico en 100 ml de agua destilada). Posteriormente se realizó una tinción de contraste con azul de anilina durante 15 minutos y se lavó con ácido acético 1%. Luego se deshidrató mediante tres pasajes de 1 minuto en etanol 100%. Se aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá.

4.7. Inmunohistoquímica para α -SMA y GFP

Para estudiar la expresión de α -SMA en tejido hepático luego del tratamiento y para analizar la presencia de células GFP en el mismo tejido se siguieron protocolos de inmunohistoquímica. Se procedió a desparafinizar el tejido en estufa a 60°C durante 20 minutos y dos pasajes de 10 minutos cada uno en xilol. Luego se hidrató el mismo en batería de alcoholes decrecientes, realizando dos incubaciones de 1

minuto en alcohol 100%, dos incubaciones de 1 minuto en alcohol 96%, dos incubaciones de 1 minuto en alcohol 70%, y una incubación de 2 minutos en agua destilada fría.

Para la recuperación antigénica se incubaron los tejidos con buffer citrato pH 6,0; se calentó en microondas a la máxima potencia durante 4 minutos, y se dejó reposar 10 minutos, se repitió el procedimiento nuevamente pero calentando solo 2 minutos, y luego nuevamente se repitió pero en esta ocasión se calentó 1 minuto, se dejó reposar 30 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos, y se procedió a bloquear la peroxidasa endógena, para lo cual se pasaron los tejidos por alcohol 70% durante 30 segundos y por alcohol 96% otros 30 segundos, luego se realizó una incubación de 20 minutos con H₂O₂ al 3% en alcohol 96%. Se hicieron 3 lavados en PBS de 5 minutos y luego se procedió al bloqueo de la biotina endógena para lo cual se realizó una incubación de 20 minutos en cámara húmeda con avidina (Blocking Kit-Vector Laboratories). Nuevamente se realizaron 3 lavados en PBS de 5 minutos y se bloqueó la avidina endógena con una incubación de 20 minutos con biotina (Blocking Kit-Vector Laboratories). Se lavaron 3 veces de 5 minutos con PBS y se bloquearon las proteínas con BSA 1% en PBS con una incubación de 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para la marcación se realizó una incubación durante toda la noche a 4°C con anticuerpo primario: anti α -SMA de ratón producido en conejo (Abcam) en una dilución 1/100 en 0,2% BSA 0,1% tritón en PBS (para α -SMA). Anti-GFP producido en conejo (Molecular Probes, Invitrogen) con una dilución 1/400 en 0,2% BSA en PBS (para GFP). Luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y luego se realizó una incubación de 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón o conejo (dilución 1/100 en 0,2% BSA en PBS, Vector Laboratories), según corresponda.

Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron durante 1 hora las muestras con AB (avidina-peroxidasa, ambos en una dilución 1/100 en 0,25% BSA en PBS). Luego se hicieron 2 lavados en PBS de 5 minutos y 2 lavados con acetato de sodio 0,1M de 5 minutos.

Para revelar se realizó una incubación de 1 minuto y 30 segundos con solución de DAB (diaminobencidina) y sulfato de amonio-níquel y luego del periodo de tiempo la reacción se detuvo con acetato de sodio 0,1M. Luego se realizaron 2 lavados con acetato de sodio 0,1M de 5 minutos y 2 lavados con PBS de 5 minutos. Luego se deshidrató con 2 pasajes en alcohol 70% de 1 minuto cada uno, 2 pasajes en alcohol 96% de 1 minuto cada uno, 2 pasajes en alcohol 100% de 1 minuto cada uno y 2 pasajes en xilol de 1 minuto, se realizó el montaje en bálsamo de Canadá.

4.8. Tinción histoquímica para la detección de ácido hialurónico

Se analizó el nivel de expresión de ácido hialurónico en tejido hepático mediante histoquímica utilizando una proteína de unión a ácido hialurónico biotinilada (bHABP, Calbiochem). Se procedió a desparafinizar el tejido en una estufa a 60°C durante 20 minutos, luego se realizaron 2 pasajes de 5 minutos en xilol y posteriormente se deshidrató mediante 2 pasajes de 1 minuto en alcohol 100%, alcohol 96% y alcohol 70% respectivamente. Luego se realizaron 2 lavados de 5 minutos en PBS y para el bloqueo de la peroxidasa endógena se volvió a deshidratar con 1 pasaje en alcohol 70% y un pasaje en alcohol 96%, ambos de 30 segundos, luego se realizó una incubación con H₂O₂ 3% en etanol durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se finalizó la hidratación mediante 1 pasaje de 30 segundos en alcohol 96%, un pasaje de 1 minuto en alcohol 70% y 2 lavados en PBS de 5 minutos.

A continuación se bloqueó la biotina endógena para lo cual se realizó una incubación de 20 minutos en cámara húmeda con avidina (Blocking Kit-Vector Laboratories). Nuevamente se realizaron 3 lavados en PBS de 5 minutos y se bloqueó la avidina endógena con una incubación de 20 minutos con biotina (Blocking Kit-Vector Laboratories). Se lavaron 3 veces de 5 minutos con PBS y se bloquearon las proteínas con BSA 1% en PBS con una incubación de 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Para la marcación de ácido hialurónico se incubó con bHABP 5 μ g/ml en PBS-BSA 0,5% durante toda la noche a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados en PBS de 5 minutos y se reveló incubando las muestras de hígado durante 30 minutos a temperatura ambiente con un conjugado enzimático avidina-peroxidasa diluida 1/100 en PBS, nuevamente se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS y se realizaron 2 lavados de 5 minutos en acetato de sodio 0,1 M. El revelado final se realizó con una incubación de 5 a 15 minutos en una solución con diaminobencidina 0,1% en agua destilada, sulfato de amonio-níquel 5%, CINH₄ 0,08% y glucosa 0,4% en acetato de amonio 0,2 M, finalmente se realizaron 2 lavados en acetato de sodio, y luego se deshidrató mediante pasajes de 30 segundos en alcohol 70%, alcohol 96%, 100% y xilol, y se montaron en bálsamo de Canadá.

4.9. Medición de citoquinas en suero mediante ELISA

Se realizó el ensayo de ELISA en muestras de suero de animales tratados. Los procedimientos de medición se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante: IL-6 (Quantikine ELISA Kit, R&D Systems), VEGF (DuoSet ELISA mouse VEGF, R&D Systems), IL-10 (BD OptEIA Set Mouse IL-10).

Como protocolo general se incubó el anticuerpo de captura en cada well durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con buffer diluyente del ensayo, luego se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se realizaron lavados y se agregó el anticuerpo de detección correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la incubación con solución sustrato durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Y finalmente se leen las absorbancias en el espectrofotómetro.

4.10. Análisis fenotípico de células dendríticas por citometría de flujo

Con el propósito de determinar el fenotipo de las células empleadas en todos los experimentos, como así mismo el grado de madurez de las CD, se realizaron análisis por citometría de flujo.

Se utilizaron 2×10^6 células que se lavaron dos veces con buffer FACS (BSA 1% en PBS). Para bloquear los receptores Fc y evitar unión inespecífica, se incubaron con suero fetal bovino (SBF) 5% en buffer FACS durante 30 minutos. Nuevamente se lavaron dos veces con buffer FACS y se incubaron durante 45 minutos, a 4°C en oscuridad con la mezcla de anticuerpos indicada (tabla 5), además se emplearon los controles de autofluorescencia correspondientes (células sin marcación).

Posteriormente se lavaron 2 veces con buffer FACS y se fijaron en una solución de paraformaldehído 1% en PBS. La lectura se realizó en citómetro de flujo (FACScalibur, Beckton Dickinson Immunocytometric Systems, San Jose, CA, USA). Los datos fueron procesados y analizados empleando el software WinMDI (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA).

Combinación 1	CD11c – PE	CD40 – FITC	CD86 – APC
Combinación 2	CD11c – PE	CMHII – FITC	CD80 – APC

Tabla 5: Combinación de anticuerpos (BD, PharMingen) utilizados en el análisis de citometría.

4.11. Análisis estadístico

Los intervalos de confianza (IC) de 95% se determinaron a través del cálculo de los valores promedio aritméticos y la varianza. Para evaluar si la diferencia entre los valores obtenidos con los distintos tratamientos fueron significativas, se utilizaron los siguientes test según correspondiera: el test de Student (T-test, Mann-Whitney) en el caso de comparaciones entre dos grupos y el análisis de la varianza (ANOVA) fue utilizado para evaluar las diferencias entre valores de más de dos grupos experimentales. Se utilizó el software Prism (Graph Pad, San Diego, CA, USA) y se consideró un $p < 0,005$ como estadísticamente significativo.

5. Resultados

5.1. Caracterización del fenotipo de las células dendríticas empleadas en la terapia adoptiva

Con el fin de determinar el fenotipo y grado de madurez de las CD empleadas para realizar la transferencia adoptiva a los animales tratados con TAA, se realizaron análisis por citometría de flujo, de moléculas que distinguen a estas células como CD11c y CMH II, y moléculas de co-estimulación: CD80 y CD86 (Figura 11, se realizaron controles de autofluorescencia e isotipo correspondientes).

En el análisis realizado se seleccionaron del total de células en suspensión las poblaciones que por los parámetros de tamaño celular y granulosidad son correspondientes a las CD. En el cultivo las células sin estimulación con LPS, y a las que llamamos CDi el porcentaje de células CD11c⁺ fue de 59,2%, mientras que en el cultivo de CD que recibieron estimulación con LPS (CDm) para inducir su maduración, se encontró un 71,0% de células CD11c⁺ (Figura 11 A).

Para conocer el grado de madurez que presentan las CD en ambos cultivos se analizó la sub-población de CD11c⁺ en cada caso y se analizaron las distintas moléculas: CMH II, CD86 y CD80. En el cultivo de CDi el porcentaje de expresión de CD CMH II⁺ es de 38,9% mientras que en el cultivo de CDm la cantidad de CD CMH II⁺ es de 53,0% (figura 10 B). Resultados similares se observaron con marcadores de moléculas coestimuladoras, en el cultivo de CDi la cantidad de células CD86⁺ es de 17,4% y de CD80⁺ es de 5,9% mientras que en el cultivo de CDm la cantidad de células CD86⁺ es de 32,9% y de CD80⁺ es de 40,9% (figura 11 C y D).

El análisis de doble marcación se estudiaron en diagramas de densidad las CD, seleccionadas con el marcador CD11c⁺ y que expresaban ambos marcadores tanto CMH II como CD 80. Se observó que el porcentaje de las células CMH II⁺ CD80⁺ (doble positivo) en el cultivo de CDi es de 25,5%, mientras que en el cultivo de CDm las células CMH II⁺ CD80⁺ (doble positivo) es de 47,6% (figura 12).

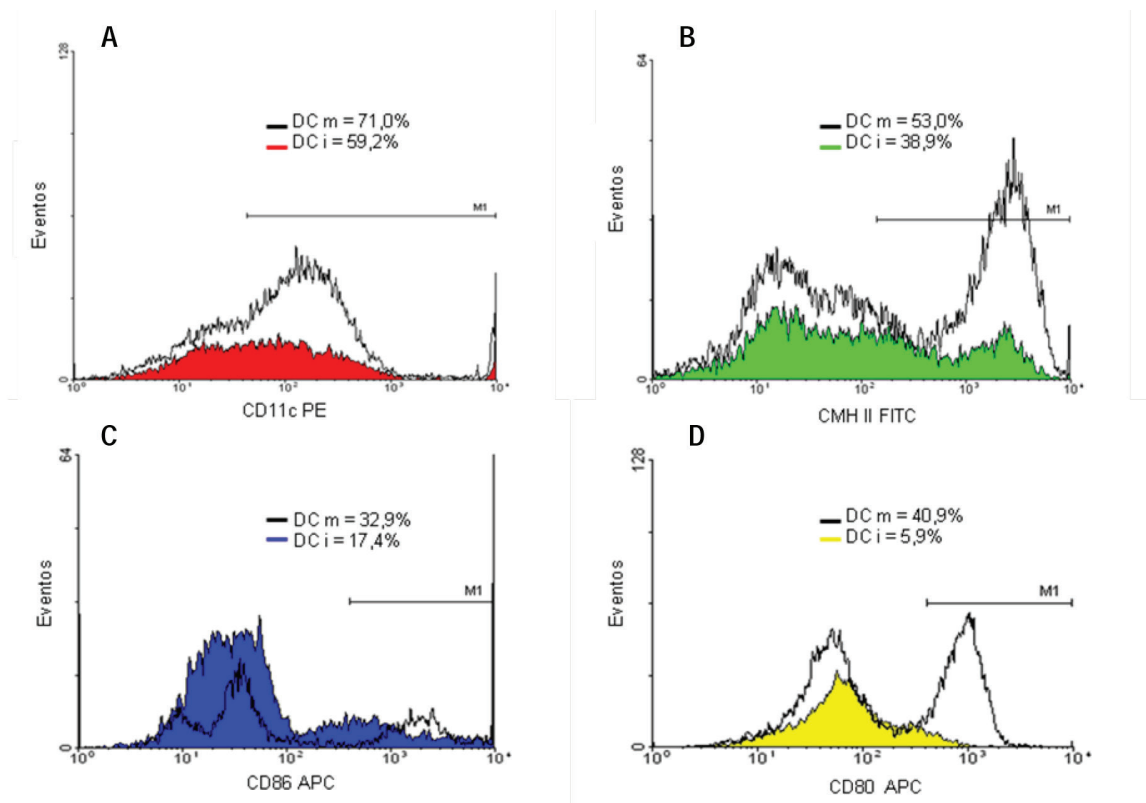


Figura 11: Análisis por citometría de flujo del cultivo de CD.

- A) histograma de expresión de CD11c en CD inmaduras (rojo) y CD maduras (línea negra).
 B) histograma de expresión de CMH II en CD inmaduras (verde) y CD maduras (línea negra).
 C) histograma de expresión de CD86 en CD inmaduras (azul) y CD maduras (línea negra).
 D) histograma de expresión de CD80 en CD inmaduras (amarillo) y CD maduras (línea negra).
 Resultados representativos de cuatro experimentos independientes.

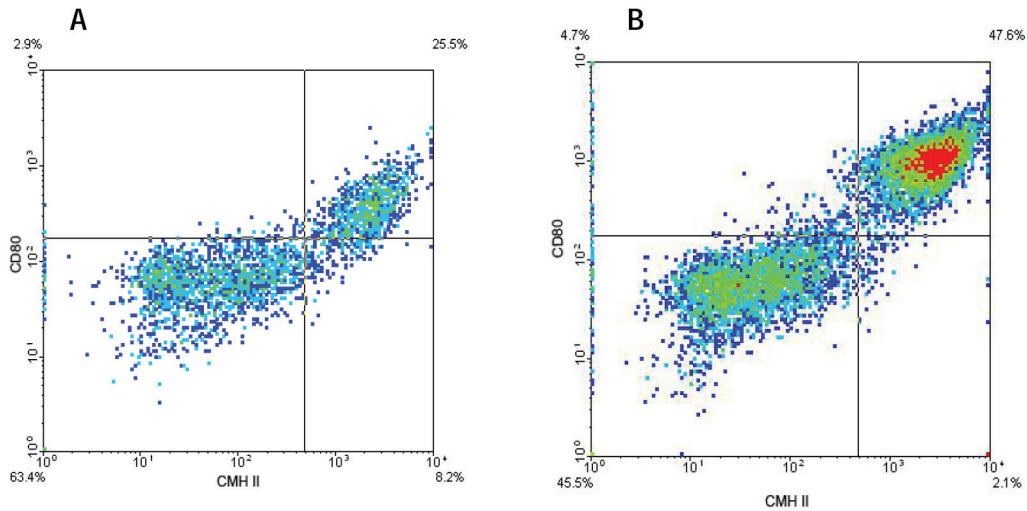


Figura 12: Análisis por citometría de flujo del cultivo de CD
 A) diagrama de densidad del cultivo de CDi. B) diagrama de densidad del cultivo de CDm.
 Resultados representativos de cuatro experimentos independientes.

5.2. Localización de las CD inoculadas exógenamente.

Para estudiar la migración de las CD una vez inoculadas por vía intravenosa y determinar que los efectos ocasionados en los distintos tratamientos sean debido a la presencia de las CD en el hígado, se analizó mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-GFP la localización de las CD en tejido hepático fibrótico dado que las CD inoculadas fueron obtenidas de animales transgénicos que expresan GFP.

En los animales control de tratamiento que no fueron inoculados con células y solo se les inyectó solución fisiológica, no se detectó señal para GFP, mientras que en los tratamientos se detectó presencia de las CD inoculadas, dado que se detectó expresión de la proteína GFP. Se pudo observar incluso un mayor nivel de CDi que de CDm (figura 13). Para establecer diferencias estadísticamente significativas en el número de células que llegan al hígado se requiere de análisis densitométrico, los cuales están siendo analizadas.

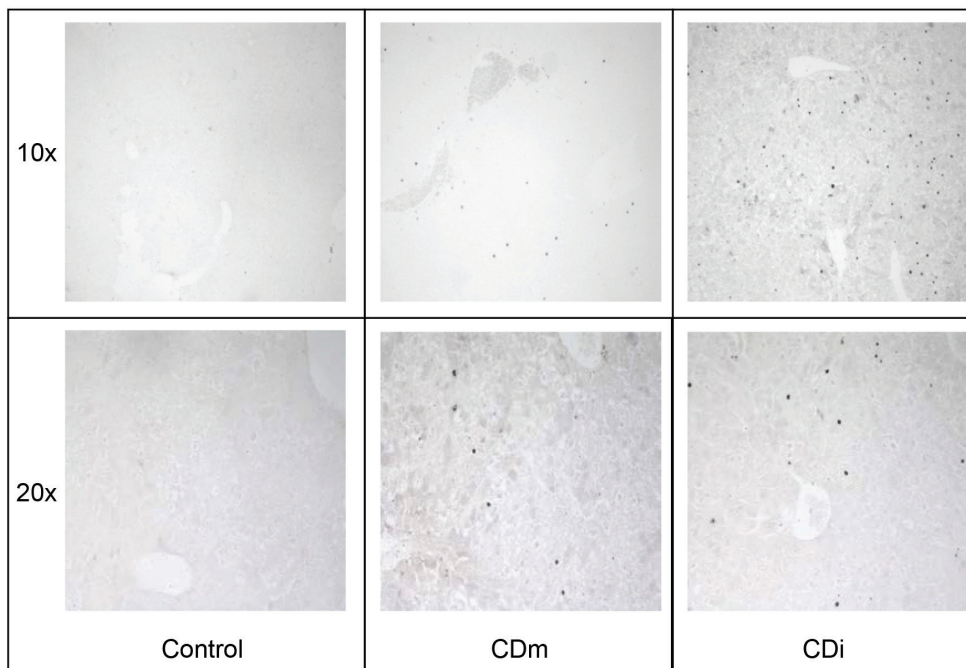


Figura 13: Inmunohistoquímica y detección CD-GFP administradas por vía intravenosa. en el hígado. Microfotografía de secciones de hígados de ratones C57 tratados con TAA; magnificación 10x (superior) y 20x (inferior).

5.3. Análisis histológico

Mediante técnicas histológicas se evaluaron cambios en el tejido hepático en respuesta a los distintos tratamientos con CD. Empleando tinción de hematoxilina & eosina se observó en el grupo control un mayor daño en el parénquima hepático con respecto a ambos tratamientos. También se observó una mayor cantidad de hepatocitos con morfología compatible con apoptosis y de células muertas (áreas claras de necrosis). Con respecto a la comparación entre ambos tratamientos, DCm o CDi, no se puede apreciar una diferencia significativa, pero se observa menor grado de injuria respecto al control, se observó mayor daño hepático y hepatocitos muertos en el grupo control y presencia de un mayor infiltrado inflamatorio. El tratamiento con CDm muestra una leve mejora cualitativa con respecto a los aspectos mencionados que el tratamiento con CDi. (figura 14). Para analizar los cambios sobre el tejido conectivo fibrótico (aparición de depósitos de colágeno) se realizó tinción tricrómico de Masson. Mediante esta tinción se pudo observar una gran cantidad de colágeno acumulado en zonas pericentrales en el grupo control que no se detecta en ambos tratamientos. (Figura 15)

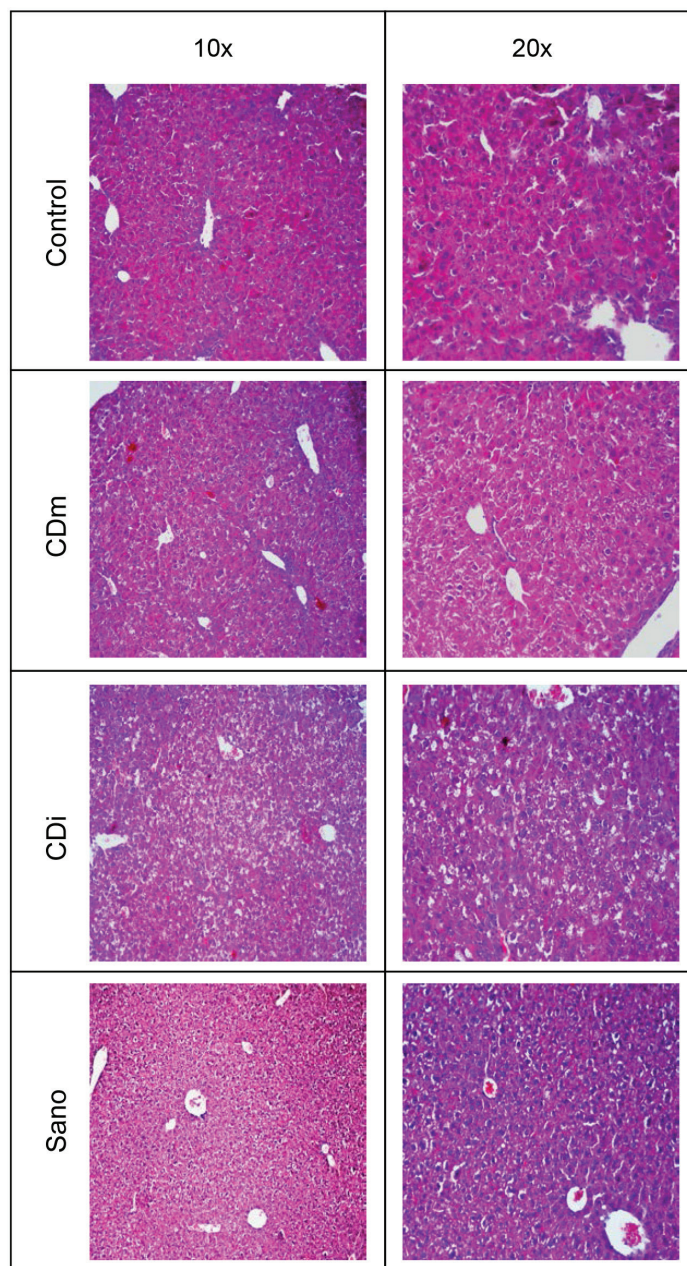


Figura 14: Tinción de hematoxilina & eosina en secciones de hígado tratados con TAA (control), DCm y CDi respectivamente. Animales sanos, sin tratamiento alguno, como control. A 10x (izquierda) y 20x (derecha).

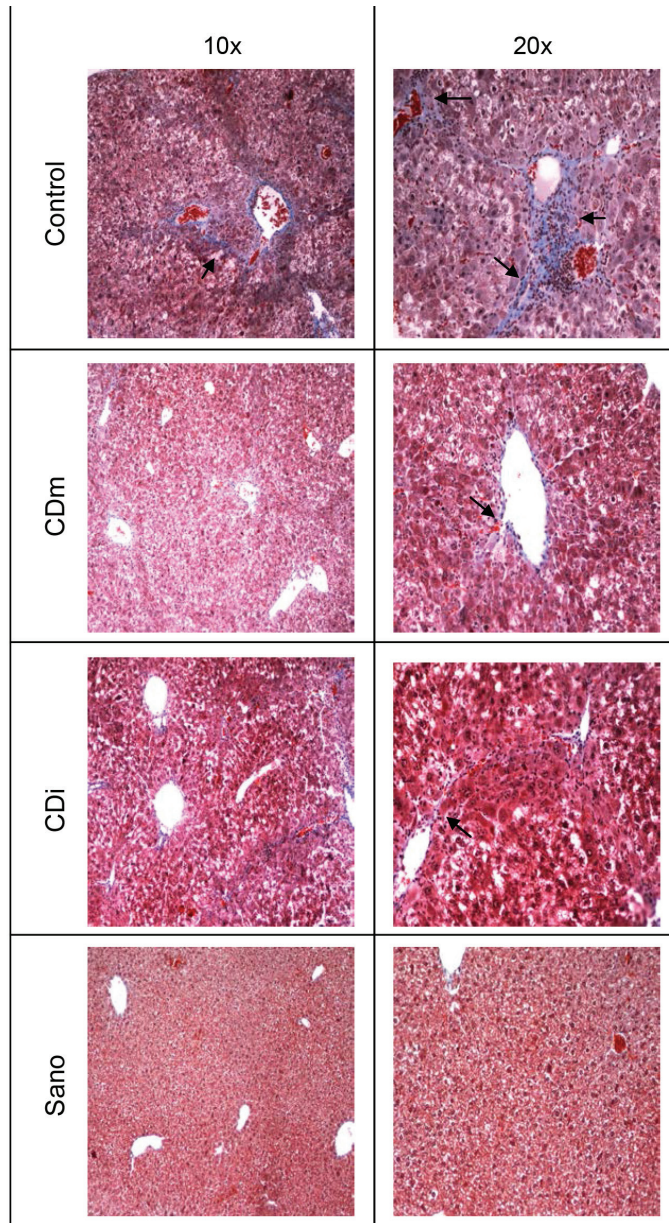


Figura 15: Tinción de tricrómico de Masson en secciones de hígado. 10x (izquierda) y 20x (derecha). Las fibras de colágeno se visualizan en color azul, con un mayor depósito en animales control que en ambos tratamientos. Se observa también un mayor infiltrado inflamatorio.

5.4. Efecto terapéutico de las CD sobre la fibrosis

Con el fin de evaluar el estado de la fibrosis en los distintos tratamientos, se evaluó el grado de fibrosis en cada grupo experimental mediante tinción histológica con rojo sirio, que colorea las fibras de colágeno, fundamentalmente de tipo I y tipo III (colágeno fibrilar). Mediante análisis morfométrico se cuantificó área total de colágeno estableciendo así con mayor precisión y objetividad el nivel de desarrollo de la fibrosis. En el control de tratamiento al cual solo se le administró solución fisiológica intravenosa, se observó daño hepático, expansión fibrótica en la mayoría de las áreas portales con puentes marcados, lo cual le da un valor de 3-4 en la escala de fibrosis del score de Ishak.

Cuando los animales fueron tratados tanto con CD maduras (CDm) como de CD inmaduras (CDi) se observó una reducción de la magnitud del daño hepático, disminución de los depósitos de colágeno, expansión fibrótica de algunas áreas portales con o sin septos fibróticos cortos, lo que da una estratificación de 1 en la escala de Ishak (Figura 16 A). Lo que indica que dichos tratamientos reduce los niveles de fibrosis.

El resultado que se observó mediante la semicuantificación del área de colágeno se correlaciona con el estado de fibrosis. El área de colágeno se redujo significativamente en el grupo tratado con CDi respecto al grupo no tratado, además se observa una mayor reducción en el grupo tratado con CDm respecto del grupo control (Figura 16 B).

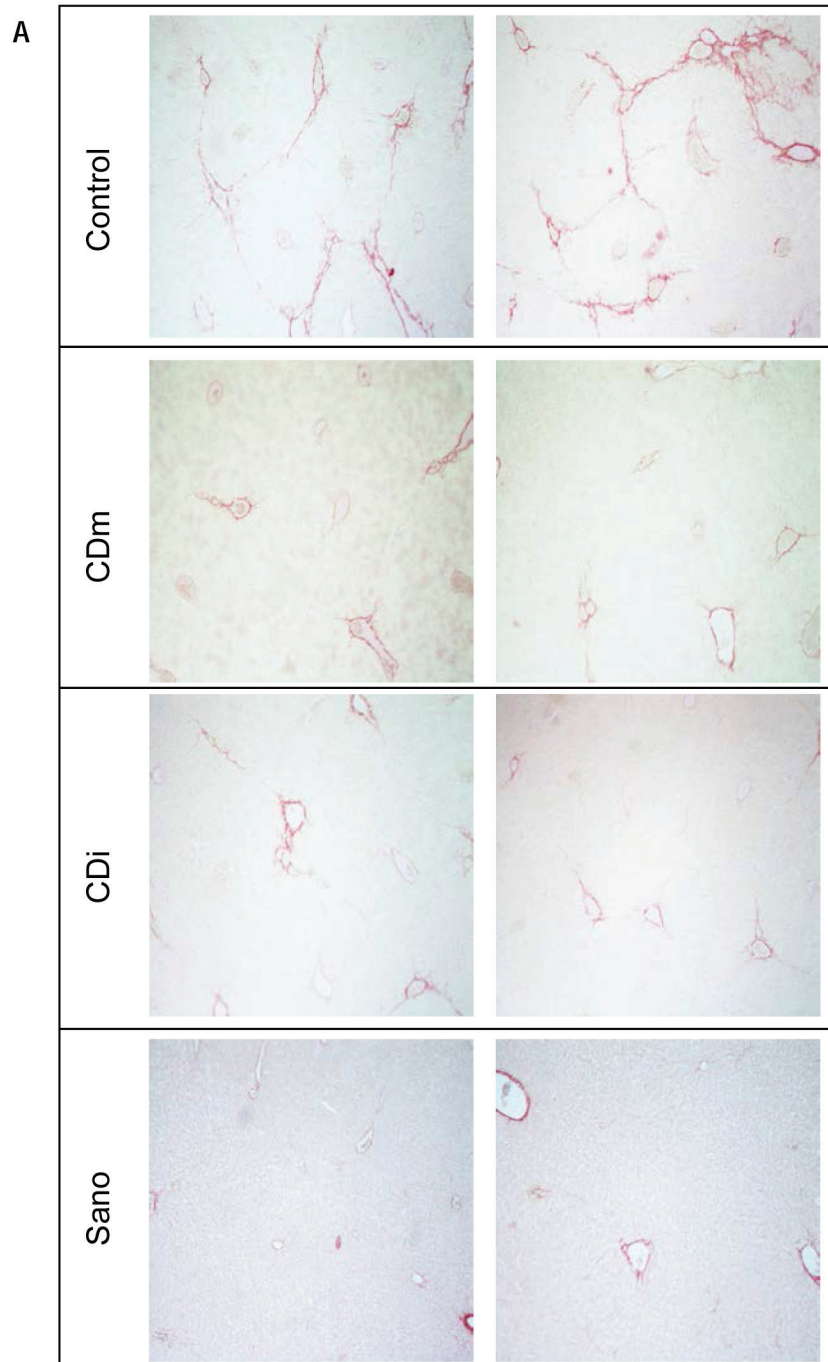


Figura 16: Efecto antifibrótico del tratamiento con CD. A) microfotografía de secciones de hígado teñidas con rojo sirio; los depósitos de colágeno se observan en rojo; magnificación 10x.

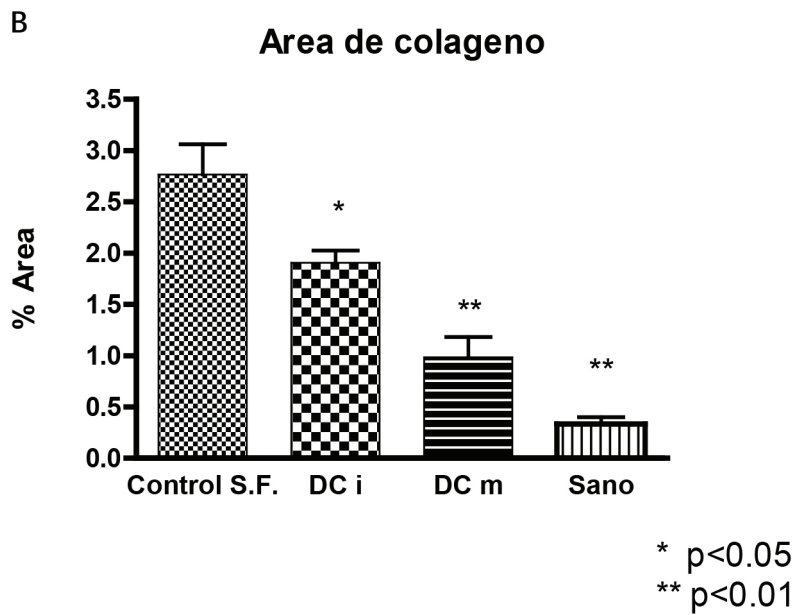


Figura 16: Efecto antifibrótico del tratamiento con CD. B) cuantificación del área positiva de colágeno.

5.5. Expresión de α -actina de músculo liso (α -SMA) en tejido hepático

Como se mencionó previamente, el proceso de activación de CEH es fundamental en la fibrogénesis hepática. Un evento correlacionado con dicho proceso es la expresión de α -SMA, proteína expresada en CEH activadas con fenotipo de miofibroblasto. Se analizó la expresión de α -SMA por inmunohistoquímica y se observó una disminución en el área total de α -SMA en ambos tratamientos tanto con CDm como con CDi en respecto al control cuando se analizó el resultado densitométricamente. (Figura 17 A, B). La diferencia no resultó estadísticamente significativa, pero si se aprecia una tendencia clara de disminución de la expresión de α -SMA que podría correlacionarse con la disminución de CEH activadas. (Figura 17 B).

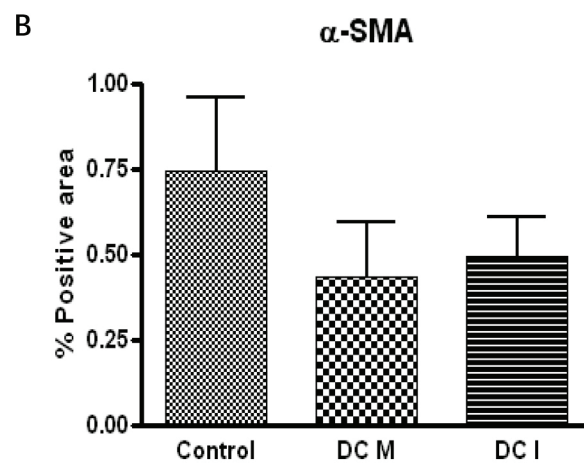
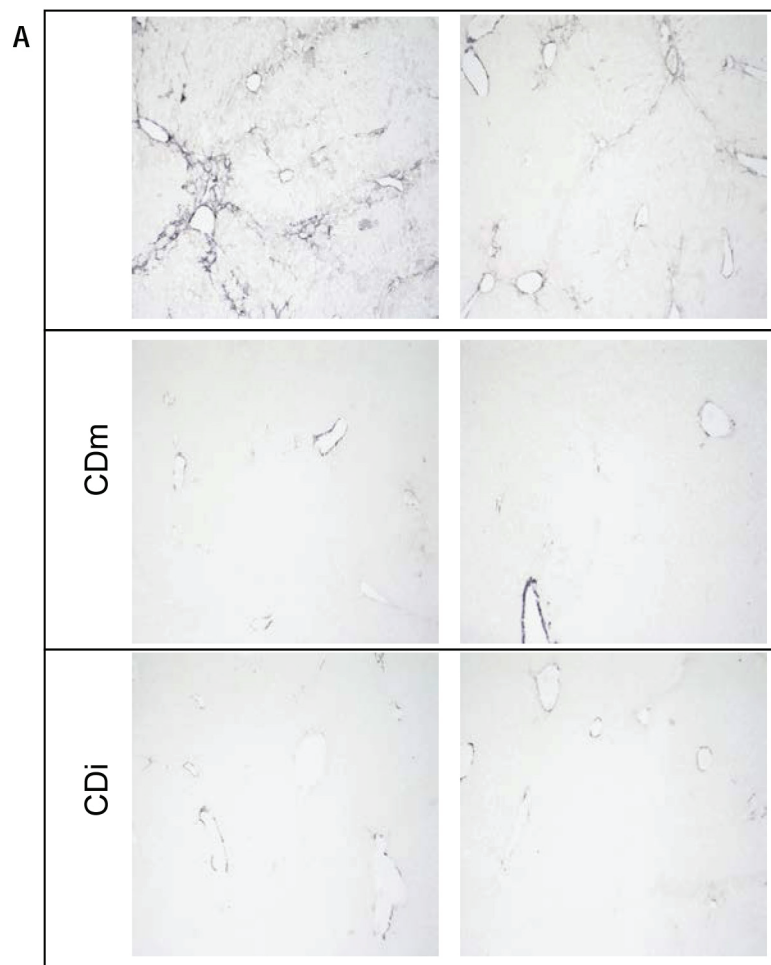


Figura 17: La administración de CD muestra disminución en el número de CEH activadas A) Microfotografía de secciones representativas de hígado de ratones C57 tratados con TAA. Inmunohistoquímica para α -SMA se muestra tinción positiva las áreas en negro. Magnificación 10x. B) Cuantificación morfométrica del área con tinción positiva.

5.6. Expresión de ácido hialurónico en tejido hepático

El ácido hialurónico (AH) es un polímero de la familia de los glucosaminoglicanos (GAG) que se encuentra presente basalmente en la MEC, cumple funciones estructurales y es capaz de modificar el com-

portamiento celular al unirse a receptores específicos [56]. Pero ante un evento de injuria, se incrementan los depósitos de ácido hialurónico aumenta y su aumento se encuentra relacionado con el proceso de fibrosis. Con el fin de detectar la expresión de esta molécula se analizó tinción histoquímica, usando una proteína de unión específica para AH. Como resultado, se observó una reducción de ácido hialurónico en los hígados de los animales tratados con CD, mientras que en los animales del grupo control se observó mayor marcación de AH, fundamentalmente en las zonas perivasculares (Figura 18).

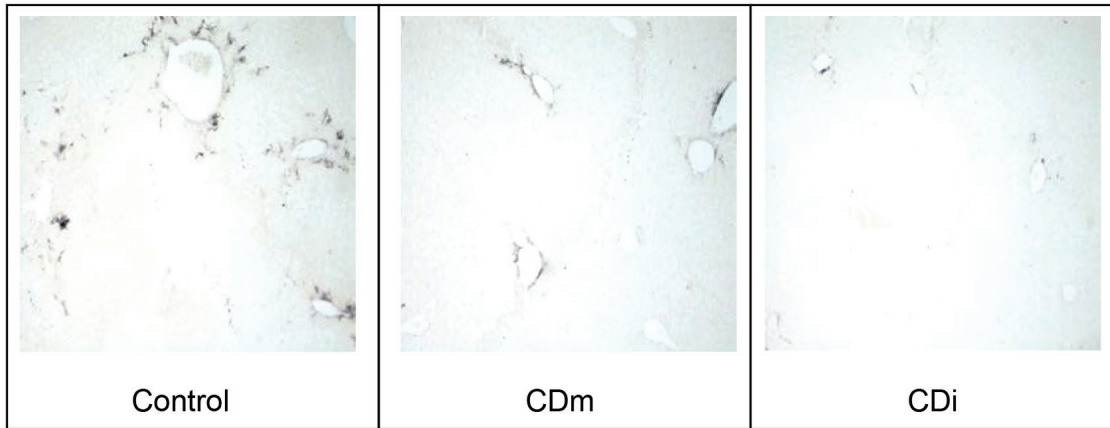


Figura 18: la administración de CD disminuye los depósitos de AH. Microfotografías representativas de secciones de hígado de ratones C57 tratados con TAA; histoquímica par AH con proteína de unión. Se observa tinción en zonas de depósitos de AH . Magnificación 10x.

5.7. Medición de citoquinas involucradas en la fibrosis hepática

Dado que los resultados obtenidos indican que el tratamiento con CD se asocia a una disminución en el grado de la fibrosis, decidimos estudiar algunas de las citoquinas involucradas en el proceso fibrogénico hepático y que podrían estar siendo liberadas por CD y de esta manera ejercer su efecto anti-fibrótico en este modelo.

Se estudio por ELISA la concentración de IL-10 (dado el papel que cumple como citoquina anti-fibrogenica) a nivel sistémico en suero de animales tratados con las CD. Los niveles de esta citoquinas fueron indetectables en todo los casos por el método utilizado (datos no mostrados).

Considerando el papel que tienen las CD en procesos como angiogénesis (Blois S., Piccioni F. y colaboradores, enviado para su publicación, 2013) se decidió medir (también por la técnica de ELISA) los niveles sistémicos de VEGF, el cual a su vez contribuye a la progresión de la fibrosis. Los resultados no arrojaron ninguna diferencia significativa entre animales tratados o no con CD, lo cual indicaría que estas células inoculadas exógenamente no afectan la producción de VEGF sistémico, debiendo considerar el análisis a nivel local para siguientes estudios (Figura 19).

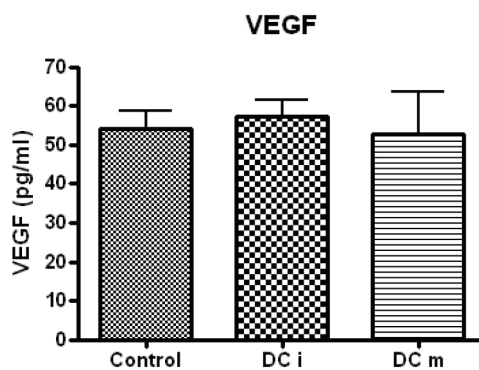


Figura 19: Gráfico de cuantificación por ELISA de la concentración de VEGEF (pg/ml).

IL-6 es una citoquina involucrada en el proceso de fibrogénesis y es secretada, entre otras células, por las CEH activadas; se ha observado que la IL-6 es un indicador del nivel de inflamación y, a su vez, contribuye a mantener el nivel de fibrosis [8]. Utilizando la técnica de ELISA se midió la concentración de IL-6 en suero y los resultados mostraron que en ambos tratamientos el nivel de esta citoquina se reduce a niveles indetectables mientras que en el grupo de animales control se encuentra elevada con respecto a los tratamientos (Figura 20).

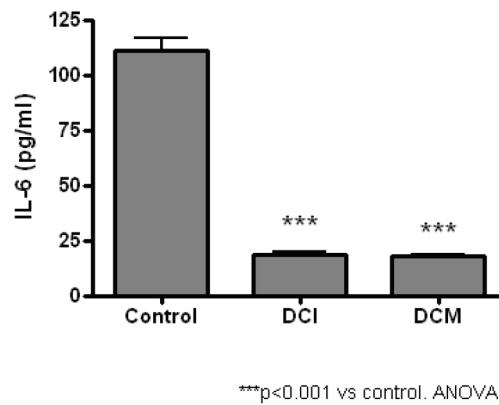


Figura 20: Gráfico de cuantificación por ELISA de la concentración de IL-6 (pg/ml), en ambos tratamientos con CD; IL-6 es indetectable.

6. Discusión

Este trabajo se enfocó en el estudio del papel que cumplen las CD en la modulación del proceso de fibrosis hepática. Nos propusimos investigar los efectos de la terapia celular adoptiva de CD en distintos grados de maduración.

Trabajos previos como el de Jiao y colaboradores [53] demostraron que deplecionando las CD en un modelo murino luego del cese del estímulo fibrogénico, aumenta el grado de fibrosis. A su vez, en otros modelos experimentales se demostró que empleando moléculas que estimulan la proliferación *in vivo* de las CD (Flt3-l), es posible aumentar la resolución de la fibrosis. Jiao y colaboradores analizaron los factores que están involucrados tanto en el proceso de resolución de la fibrosis como el papel que podrían tener las CD en ese modelo animal, concluyendo que el factor crucial en este proceso son las MMPs secretadas por las CD, que disminuyen el grado de fibrosis al degradar el colágeno y las proteínas de la MEC acumulada en el parénquima hepático [57].

Tomando como base dichos antecedentes, se propuso analizar si la inoculación exógena de CD ejercía alguna diferencia en la magnitud de la progresión de la fibrosis hepática en estadios tempranos, es decir durante la inducción de la injuria hepática. Además se ha comparado el efecto que producen las CD tanto inmaduras como maduras. Entendimos que estudiar esta diferencia era importante debido a que las CDm tienen la capacidad de secretar citoquinas y factores que resulten antifibrogénicos, así como también incrementar la degradación de colágeno acumulado y aumentar la apoptosis de las CEH activadas [53]. Con este fin se usó un protocolo para generar CD partiendo de médula ósea de ratón [58], estimulando este cultivo con GM-CSF y pulsando con LPS las CD se obtuvieron CDm. Para generar CDi no se empleó LPS en el cultivo. Se evaluaron los fenotipos de los distintos cultivos mediante citometría de flujo el porcentaje de CD empleando el marcador CD11c y los distintos marcadores de maduración como CD80, CD86 y CMH II. En cuanto al porcentaje de células CD11c⁺ se vio que el cultivo de CDi tenía 59,2% que en principio es un porcentaje dentro de los parámetros esperados; en cuanto al cultivo de CDm se observó un porcentaje mayor al 70-90%.

Dentro de la población de células CD11c⁺ (ya caracterizadas como CD) se analizaron los marcadores de maduración; los resultados mostraron que una mayor cantidad de células en el cultivo de CDm expresaban los marcadores CMH II, CD86 y CD80 en comparación con el cultivo de CDi, a su vez analizando por diagrama de densidad la doble marcación de CD80 y CMH II se observó que en ambos cultivos se diferencian dos subpoblaciones una que resultaron negativas para ambos marcadores y la otra que resultó positiva, la conclusión de estos datos es que en el caso de las CDm las células doble positivo son células que expresan a la vez dos marcadores de maduración por lo tanto se confirma el fenotipo esperado, mientras que en el caso de las CDi la población más importante es la de células doble negativo que confirma el fenotipo de células dendríticas inmaduras.

Posteriormente se propuso estudiar en el modelo la localización de las células inoculadas vía intravenosa a ratones C57 tratados previamente con TAA para desarrollar fibrosis.

Como se explicó previamente las células inoculadas expresaban constitutivamente GFP ya que fueron obtenidas de ratones transgénicos que expresan dicha proteína, esto permitió mediante una inmunohistoquímica para GFP detectar dichas células en el hígado, cualitativamente se observó una mayor cantidad de células en los ratones tratados con CDi que los tratados con CDm, la presencia de estas células en el hígado confirman que los resultados obtenidos como consecuencia de este tratamiento son debido a las células inoculadas ya que no se observó marcación positiva en los controles de solución fisiológica. Además se puede concluir que a pesar de observarse mayor número de CDi en el hígado, esto no mejora la capacidad antifibrotica de las células inoculadas, por lo contrario parecen presentar menor acción. Si bien no fue estudiado en este trabajo se piensa que las CDm migraron en mayor cantidad al bazo con respecto a las CDi por estar estimuladas y cumplir su función en dicho órgano [59].

Con respecto al tratamiento y a la terapia adoptiva utilizada se observaron importantes cambios positivos en cuanto a la morfología y microarquitectura hepática en ambos grupos experimentales, es decir tratados con CD, y una significativa y marcada reducción de los depósitos de colágeno en el grupo tratado con CDm, esto confirma la hipótesis planteada. También se observó una reducción en la expresión de la proteína α -SMA que se correlaciona con la activación de células hepáticas estrelladas, este resultado indica que las CD en ambos tratamientos tienen incidencia en el comportamiento de CEH activadas.

Los resultados del análisis de ácido hialurónico realizados con el objetivo de detectar depósitos de esta molécula [18] demostraron que existe una relación en el proceso de retardo de fibrosis mediada por las CD y la degradación del ácido hialurónico acumulado previamente en el proceso fibrogénico, esto a la vez se correlaciona con la disminución de colágeno y de CEH activadas previamente mencionada.

Debido a la naturaleza de las CD para organizar la respuesta inmunológica dentro del hígado y de secretar distintos factores y citoquinas que modulan tanto la inflamación hepática como la tolerancia inmunológica en este órgano, estas podrían ejercer su acción anti-fibróticos, por las propias citoquinas que liberan o por interactuar con células del entorno modulando la expresión de ciertos factores que resultan moduladores de la fibrosis hepática; es por eso que se estudiaron las concentraciones de citoquinas tales como IL-6 o IL-10 [8, 32]. Observamos la disminución de la concentración de IL-6 en suero de ambos grupos experimentales, lo que se podría concluir que las CD exógenas de algún modo interviene para disminuir la síntesis de esta citoquina. Respecto a la IL-10 al resultar indetectable por el método utilizado no se puede concluir que las CD estén modificando el perfil de secreción de esta citoquina.

Al igual que las citoquinas previamente mencionadas, resultaba crucial investigar el perfil citoquinas pro-angiogénicas como el VEGF y considerando además trabajos recientes que indican que las CD son capaces de intervenir en ciertos procesos angiogénicos (datos a publicar Blois S, Piccioni F *et. al. Hepatology* 2013). Como resultado no se observó diferencia en la concentración de VEGF sérica de los animales tratados, por lo que se puede sugerir que en el estadio de la fibrosis del modelo donde se hicieron los análisis las CD no intervienen directamente modificando concentración de VEGF, aunque mas estudios serian necesarios para concluir si estas células intervienen o no en el proceso de angiogénesis en la fibrosis hepática.

7. Conclusiones

- Las células dendríticas obtenidas de medula ósea de ratón poseen el fenotipo esperado y el grado de maduración de las CDm, observado mediante la expresión de moléculas coestimuladoras y marcadores de maduración se encuentra dentro de lo esperado.
- Las células dendríticas inoculadas por vía intravenosa son capaces de migrar al hígado y ejercer efectos locorregionales.
- La transferencia adoptiva de células dendríticas a ratones con fibrosis avanzada, modelo de TAA, es capaz de disminuir el grado de fibrosis hepática.
- Las CD maduras tienen mayor efectos inhibitorio de la fibrosis que las CD inmaduras.
- Igualmente CD maduras como las inmaduras administradas por vía sistémica reducen la expresión de α -SMA, lo que podría correlacionarse con un menor número de CEH activadas.
- La administración de CD genera cambios en el microambiente inflamatorio, dado que se observaron cambios en los niveles sistémicos de IL-6, los mismos se encuentran reducidos.
- El empleo de CD maduras podría considerarse como una herramienta terapéutica promisorio para inhibir la fibrogénesis hepática.

8. Bibliografía

1. Couinaud, C., *Le Foie: Etudes Anatomiques et Chirurgicales*. 1957, Masson publishing: New York.
2. Porth, ed. *Fisiopatología. Salud-enfermedad: un enfoque conceptual*. 7 edición ed. 2009, Editorial Panamericana.
3. Theise, N.D., et al., *The canals of Hering and hepatic stem cells in humans*. *Hepatology*, 1999. **30**(6): p. 1425-33.
4. Catalano, O.A., et al., *Vascular and biliary variants in the liver: implications for liver surgery*. *Radiographics*, 2008. **28**(2): p. 359-78.
5. Wallace, K., A.D. Burt, and M.C. Wright, *Liver fibrosis*. *Biochem J*, 2008. **411**(1): p. 1-18.
6. Rappaport, A.M., *The structural and functional unit in the human liver (liver acinus)*. *Anat Rec*, 1958. **130**(4): p. 16.
7. Poli, G., *Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress*. *Mol Aspects Med*, 2000. **21**(3): p. 49-98.
8. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(2): p. 209-18.
9. Friedman, S.L., *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(6): p. 1655-69.
10. Knolle, P.A. and G. Gerken, *Local control of the immune response in the liver*. *Immunol Rev*, 2000. **174**: p. 21-34.
11. Teixeira-Clerc, F., et al., *CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis*. *Nat Med*, 2006. **12**(6): p. 671-6.
12. Pinzani, M. and K. Rombouts, *Liver fibrosis: from the bench to clinical targets*. *Dig Liver Dis*, 2004. **36**(4): p. 231-42.
13. Friedman, S.L., *Cytokines and fibrogenesis*. *Semin Liver Dis*, 1999. **19**(2): p. 129-40.
14. Anthony, P.P., et al., *The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization*. *J Clin Pathol*, 1978. **31**(5): p. 395-414.
15. Heidelbaugh, J.J. and M. Bruderly, *Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation*. *Am Fam Physician*, 2006. **74**(5): p. 756-62.
16. Lieber, C.S., *Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years*. *Rocz Akad Med Bialymst*, 2005. **50**: p. 7-20.
17. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(4): p. 2247-50.
18. Friedman, S.L., *Liver fibrosis -- from bench to bedside*. *J Hepatol*, 2003. **38 Suppl 1**: p. S38-53.
19. Geerts, A., *History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells*. *Semin Liver Dis*, 2001. **21**(3): p. 311-35.
20. Reynaert, H., et al., *Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension*. *Gut*, 2002. **50**(4): p. 571-81.
21. Nieto, N., S.L. Friedman, and A.I. Cederbaum, *Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species*. *Hepatology*, 2002. **35**(1): p. 62-73.
22. Alcolado, R., M.J. Arthur, and J.P. Iredale, *Pathogenesis of liver fibrosis*. *Clin Sci (Lond)*, 1997. **92**(2): p. 103-12.
23. Friedman, S.L., *Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies*. *N Engl J Med*, 1993. **328**(25): p. 1828-35.
24. Gressner, A.M. and R. Weiskirchen, *Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets*. *J Cell Mol Med*, 2006. **10**(1): p. 76-99.
25. Vyas, S.K., et al., *Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture*. *Gastroenterology*, 1995. **109**(3): p. 889-98.
26. Winwood, P.J., et al., *Kupffer cell-derived 95-kd type IV collagenase/gelatinase B: characterization and expression in cultured cells*. *Hepatology*, 1995. **22**(1): p. 304-15.
27. Theret, N., et al., *MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells*. *Hepatology*, 1999. **30**(2): p. 462-8.
28. Benyon, R.C., et al., *Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation*. *Hepatology*, 1999. **30**(4): p. 977-86.
29. Tsuruta, S., et al., *Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy prevents dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats*. *Int J Mol Med*, 2004. **14**(5): p. 837-42.

30. Schwabe, R.F., R. Bataller, and D.A. Brenner, *Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. **285**(5): p. G949-58.
31. Gieling, R.G., K. Wallace, and Y.P. Han, *Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. **296**(6): p. G1324-31.
32. Zhang, L.J., et al., *Antifibrotic effects of interleukin-10 on experimental hepatic fibrosis*. *Hepatology*, 2007. **45**(7): p. 2092-8.
33. Rockey, D.C. and J.J. Chung, *Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis*. *J Invest Med*, 1994. **42**(4): p. 660-70.
34. Bachem, M.G., et al., *Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis*. *J Clin Invest*, 1992. **89**(1): p. 19-27.
35. Borkham-Kamphorst, E., et al., *Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis*. *Lab Invest*, 2004. **84**(6): p. 766-77.
36. Gressner, O.A. and A.M. Gressner, *Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases*. *Liver Int*, 2008. **28**(8): p. 1065-79.
37. Corpechot, C., et al., *Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis*. *Hepatology*, 2002. **35**(5): p. 1010-21.
38. Yu, C., et al., *Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(4): p. 1653-62.
39. Xia, J.L., et al., *Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(5): p. 1500-12.
40. Canturk, N.Z., et al., *Protective effect of IGF-1 on experimental liver cirrhosis-induced common bile duct ligation*. *Hepatology*, 2003. **37**(5): p. 2061-6.
41. Sozzani, S., et al., *Dendritic cell-endothelial cell cross-talk in angiogenesis*. *Trends Immunol*, 2007. **28**(9): p. 385-92.
42. Gressner, O.A., R. Weiskirchen, and A.M. Gressner, *Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options*. *Comp Hepatol*, 2007. **6**: p. 7.
43. Connolly, M.K., et al., *In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(11): p. 3213-25.
44. Hunter, A.L., M.A. Holscher, and R.A. Neal, *Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1977. **200**(2): p. 439-48.
45. Ambrose, A.M., E.F. De, and L.J. Rather, *Toxicity of thioacetamide in rats*. *J Ind Hyg Toxicol*, 1949. **31**(3): p. 158-61.
46. Steinman, R.M. and M.D. Witmer, *Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. **75**(10): p. 5132-6.
47. Palucka, K. and J. Banchereau, *Cancer immunotherapy via dendritic cells*. *Nat Rev Cancer*. **12**(4): p. 265-77.
48. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. *Cell*, 2001. **106**(3): p. 255-8.
49. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
50. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(3): p. 151-61.
51. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(12): p. 984-93.
52. Notas, G., T. Kisseleva, and D. Brenner, *NK and NKT cells in liver injury and fibrosis*. *Clin Immunol*, 2009. **130**(1): p. 16-26.
53. Jiao, J., et al., *Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression*. *Hepatology*. **55**(1): p. 244-55.
54. Duffield, J.S., *Dendritic cells take on more tasks in the liver?* *Hepatology*. **55**(1): p. 16-9.
55. Ishak, K., et al., *Histological grading and staging of chronic hepatitis*. *J Hepatol*, 1995. **22**(6): p. 696-9.
56. Noble, P.W., *Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair*. *Matrix Biol*, 2002. **21**(1): p. 25-9.
57. Senties-Gomez, M.D., et al., *[Hepatic fibrosis: role of matrix metalloproteases and TGFbeta]*. *Gac Med Mex*, 2005. **141**(4): p. 315-22.

58. Inaba, K., et al., *Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1693-702.
59. Del Prete, A., et al., *Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function*. Blood, 2007. **109**(2): p. 626-31.