

POINT OF VIEW

Kupffer cells and alcoholic liver disease

F. J. Cubero and N. Nieto

Department of Medicine. Division of Liver Diseases. Mount Sinai School of Medicine. New York, USA

ABSTRACT

Liver disease is a major cause of illness and death worldwide. A central component in the complex network leading to the development of alcoholic liver disease is the activation of Kupffer cells by endotoxin and other soluble mediators. Alcohol consumption induces a state of 'leaky gut' increasing plasma and liver endotoxin levels. When Kupffer cells become activated, they interact with a complex of proteins located on the extracellular membrane signaling to produce a wide array of soluble factors, including cytokines, chemokines, growth factors, cyclooxygenase and lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species such as superoxide anion, hydrogen peroxide, and nitric oxide, all of which provide physiologically diverse and pivotal paracrine effects on all other liver cell types and, ultimately, liver injury. Kupffer cells are also central to the liver homeostatic response to injury as upon cellular degenerative changes, they immediately respond to the insult and release mediators to orchestrate inflammatory and reparative responses. Thus, the homeostatic responses are initiated by Kupffer cell-derived mediators at the cellular level and underlie the liver's defense and reparative mechanisms against injury. In order to understand better the role of Kupffer cells in the onset of liver injury, animal models in which Kupffer cells are inactivated, and cell culture settings (e.g. co-cultures) are being used with promising results that advance our understanding of alcoholic liver disease.

Key words: Kupffer cells. Alcoholic liver disease. Reactive oxygen species. Lipopolysaccharide. Hepatic stellate cells.

Cubero FJ, Nieto N. Kupffer cells and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 460-472.

Supported by US Public Health Service Grant 1R01 DK 069286-01A1 from the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.

Recibido: 19-05-06.
Aceptado: 23-05-06.

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

ABBREVIATIONS (IN ALPHABETICAL ORDER)

Alcoholic liver disease (ALD); arachidonic acid (AA); carcinoembryonic antigen (CEA); c-Jun kinase (JNK); Cyclooxygenase (COX); dilinoleoylphosphatidylcholine (DLPC); early-immediate gene-1 (Egr-1); endotoxin or lipopolysaccharide (LPS); ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA); extracellular membrane (ECM); extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2); glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); glutathione (GSH); glutathione disulfide (GSSG); glutathione-S-transferase (GST); hepatic stellate cells (HSC); hydroxyl radical (OH[•]); leukotrienes (LT); lipoxygenase (LOX); low-density lipoprotein (LDL); LPS-binding protein (LBP); major histocompatibility complex (MHC); nitrate (NO₃⁻); nitric oxide (NO); nitric oxide synthase (NOS); nitrite (NO₂⁻); nuclear factor-kappa beta (NF-κB); P₄₅₀ cytochrome 2E1 (CYP2E1); peroxydinitrite (ONOO⁻); phospholipase A₂ (PLA₂); platelet activation factor (PAF); platelet-derived growth factor (PDGF); propylthiouracil (PTU); prostaglandin D₂ (PGD₂); prostaglandin E₂ (PGE₂); prostaglandin H₂ (PGH₂); reactive oxygen species (ROS); superoxide anion (O₂^{•-}); superoxide dismutase (SOD); transforming growth factor-beta (TGF-β); transmembrane toll-like receptor (TLR); tumor necrosis factor-alpha (TNF-α); very-low-density lipoprotein (VLDL).

GENERAL ARCHITECTURE OF THE LIVER

There are five different cell types in the liver which occupy about 80% of the hepatic volume. The remaining 20% of the hepatic volume comprises the extracellular space and extracellular matrix. Among the liver cells, hepatocytes are the largest in size and the most abundant as they occupy close to 50 to 60% of the total liver volume and account for two-thirds of total liver cells. The other four cell types are referred to as non-parenchymal or liver

sinusoidal cells. They are smaller in size and lesser in number than the parenchymal cells (1).

The liver sinusoidal cells play a critical role in the maintenance of liver function, under both physiological and pathological conditions (2). The hepatic sinusoidal cells are endothelial cells, Kupffer cells, stellate cells (fat-storing cells or Ito cells), and pit cells (NK cells). This review will focus on the role of Kupffer cells.

KUPFFER CELLS

Kupffer cells are liver-specific macrophages which were first identified in the liver by von Kupffer (1876) (3). Kupffer cells are amoeboid in shape and adhere to the surface of fenestrated sinusoidal endothelial cells. In the cytosol of Kupffer cells, there are a number of dense bodies and electron-lucent vacuoles of various sizes including lysosomes. Golgi apparatus, coated vesicles, pinocytotic vesicles, ribosomes, centrioles, microfilaments, and microtubules are also present in the cytosol (4). The nucleus of Kupffer cells is ovoid or indented, and occasionally lobulated (5). Wormlike structures, fuzzy coat, microvilli, and pseudopodia at the cell surface are characteristic structural components of Kupffer cells involved in endocytic mechanisms (6). Kupffer cells incorporate large particles such as erythrocytes and bacteria by phagocytosis and take up small particles and molecules via pinocytotic vesicles (7-12).

Peroxidase activity is observed in the rough endoplasmic reticulum, nuclear envelope, and annulate lamellae (13,14). The majority of Kupffer cells display an endogenous peroxidase pattern typical of resident tissue macrophages and show positive staining for macrophage markers such as ED1, ED2, and Ki-M2R in rats and F4/80 in mice (6,15). Other markers are the presence of inducibility of major histocompatibility complex (MHC) class II antigens (16), receptors for fructose and galactose-exposing glycoproteins (17,18), peroxidase activity, and the capacity to phagocytose fluorescent labeled latex particles (19). Kupffer cells display high glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity, which plays an important role in the metabolic response to phagocytosis. A key enzyme present in Kupffer cells is NADPH oxidase which plays a decisive role in the development of alcohol-induced liver injury (20). The cytochrome P₄₅₀ enzymes, and concretely P₄₅₀ 2E1 (CYP2E1), are also expressed in Kupffer cells. In addition, several glutathione-S-transferase (GST) isoenzymes and glutathione peroxidase may enable the Kupffer cell to detoxify potentially hepatotoxic substances (21-23).

FUNCTION OF KUPFFER CELLS

Kupffer cells have many specific functions that are essential for the preservation of homeostasis in the liver un-

der several conditions. Endocytosis, pivotal for maintaining homeostasis, is not only essential for the removal of several (plasma) proteins and other material from the blood, but the receptor-mediated uptake of these substances is directly coupled with a metabolic response, leading to the production of cytokines and eicosanoids. Both cytokines and eicosanoids may act subsequently in an autocrine and/or paracrine fashion.

Clearance of galactose-terminated particles from the circulation is performed by a galactose-specific receptor in Kupffer cells (24). The Mannose/N-acetylglucosamine receptor is probably involved in the clearance of larger mannose-exposing particles, like potentially hazardous microorganisms such as bacteria, yeast, and parasites (25). Low-density lipoproteins (LDL) are almost exclusively taken up by Kupffer cells (26). Kupffer cells possess an additional receptor which binds oxidatively modified LDL, very low-density lipoprotein (VLDL), and lipoprotein A (27-29).

Like endothelial cells, Kupffer cells bind IgG immune complexes, which may contribute significantly to the normal host defense (30,31). The uptake of IgA immune complexes is mediated by a specific receptor present in Kupffer cells, which recognizes the Fc part of IgA (32, 33). Under several pathological conditions, like primary biliary cirrhosis, obstructive jaundice, and ethanol consumption, the capacity of Kupffer cells to take up immunoglobulin immune complexes is reduced, which may lead to a reduction of the host defense capacity. Kupffer cells possess receptors for the complement components C1q and C3b (30,34). Complement factors adhere to immunoglobulins (35), DNA, bacteria, and platelets (36-38). Human Kupffer cells also express several complement receptors, and the presence of CR1, CR3, and CR4 receptors provides Kupffer cells with an optimal capacity to remove complexes coated with complement from the circulation (39).

The effects of platelet activation factor (PAF) on the liver are mediated by Kupffer cells that possess specific binding sites for PAF (40). Carcinoembryonic antigen (CEA) is a gut-derived glycoprotein that is cleared from the circulation by Kupffer cells (41). These binding sites may be important for the development of liver metastases (42). Several cellular components, like DNA and cell-derived enzymes, are released during cell death in several clinical situations. DNA can be removed from the circulation by binding to a receptor on the Kupffer cells without opsonization (43).

KUPFFER CELLS ISOLATION, PURIFICATION AND CULTURE

One of the first methods to isolate Kupffer cells was based in the *in vivo* uptake of iron particles by Kupffer cells, washing the sinusoidal cells out of the liver, and purifying the Kupffer cells using magnets (44). Later, chela-

tors such as citrate, tetraphenylboron, or ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) were used to prepare liver cell suspensions, and iron-loaded Kupffer cells were isolated using magnets (45-48). These methods provided only low numbers of viable sinusoidal cells and contamination with other cell populations remained an issue of concern. Alternative isolation procedures described by Berry and Friend (49) and Seglen and Gjessing (50), and modified by Arahuetes et al. (51), utilized collagenase for the perfusion and dispersion of the liver, and were used to isolate parenchymal and non-parenchymal cells simultaneously from the same liver. Pronase, which preferentially destroys parenchymal liver cells, can be used directly for digestion of the liver or can be used in addition to collagenase digestion.

When centrifugal elutriation was introduced in the protocol, the yield was much higher as contamination of the endothelial and Kupffer cell fractions by blood lymphocytes and so-called blebs was minimized (52). Percoll density gradients, followed by selective adherence of both Kupffer and endothelial cells, have been described in order to obtain pure cell fractions from the crude non-parenchymal liver cell suspensions (53). Centrifugal elutriation after an initial gradient in Histodenz or Nycodenz to separate Kupffer cells and endothelial cells from sellate cells is generally the method of choice (54).

Finally, separation by velocity sedimentation, which is based on the same physical properties as elutriation, normally gives less satisfactory results unless high-resolution equipment is used and diminishes the viability of both fractions as longer times are required (55). These cultured cells are still capable of phagocytosis of colloidal carbon and latex particles and may preserve their functions, with regard to endocytosis, for at least two weeks in culture.

ALCOHOLIC LIVER DISEASE (ALD) AND KUPFFER CELLS

Endotoxin

Alcoholic liver disease (ALD) involves several stages of liver injury: steatosis, alcoholic steatohepatitis, alcoholic hepatitis, and cirrhosis (56). Kupffer cells play an important role in alcohol-induced liver damage. Alcohol increases the gut permeability to endotoxin or lipopolysaccharide (LPS), a major constituent of the outer membrane of gram-negative bacteria, which triggers a variety of inflammatory reactions, including the release of proinflammatory cytokines and other soluble factors (11). Adachi and colleagues showed that the inactivation of Kupffer cells using gadolinium chloride prevents early alcohol-induced liver injury, and that a concurrent reduction of the ethanol-induced CYP2E1 induction was observed (57). They also showed that intestinal sterilization with antibiotics (polymyxin B and neomycin) could pre-

vent alcohol-induced liver injury by reducing intestinal bacteria and lowering the risk for endotoxemia (58).

Multiple mammalian receptors for LPS have been identified, including two glycoproteins: LBP and CD14. CD14 binds to the LPS-binding protein (LPS-LBP) complex but is not, by itself, capable of initiating a transmembrane activation signal (6). It has been postulated that LPS/CD14 complexes interact with a transmembrane toll-like receptor (TLR) responsible for signal transduction (59).

Both *in vivo* and *in vitro* data suggest that chronic ethanol sensitizes Kupffer cells to at least some LPS-mediated responses. For example, chronic ethanol consumption increases the susceptibility of rats to LPS-induced liver injury (60). Hijioka et al. showed that binge ethanol drinking rapidly inactivated voltage-dependent Ca^{2+} channels in Kupffer cells becoming activated to release other critical mediators (61). Thus, inactivation of these channels may be involved in mechanisms of rapid tolerance to ethanol (62).

Shibayama et al. showed that acute administration of ethanol enhanced endotoxin hepatotoxicity. In his work, Kupffer cells became sensitized to LPS in cells isolated 24 hours after ethanol administration as reflected by increased intracellular Ca^{2+} , tumor necrosis factor- α (TNF- α) production, and large increases in CD14. These effects were all blocked by antibiotics, indicating that sensitization of Kupffer cells by ethanol is also mediated by gut-derived LPS (63).

Oxidative stress

Oxidative stress caused by generation of reactive oxygen species (ROS) during alcohol consumption is suggested as one of the major mechanisms of alcohol-induced liver injury (56,61-71). ROS can be generated by a variety of enzymes including, but not limited to CYP2E1, NADH/NADPH oxidase, xanthine oxidase, and arachidonic pathways, such as lipoxygenase (LOX) and cyclooxygenase (COX). Induction of ROS can be also triggered by damaged mitochondria as it happens in ALD (72-76).

Kupffer cells contain superoxide dismutase (SOD) that dismutates $O_2^{\cdot -}$ (superoxide anion) to yield H_2O_2 . H_2O_2 and $O_2^{\cdot -}$ can interact via the Fenton reaction to produce more powerful and cytotoxic radicals, such as OH^{\cdot} (hydroxyl radical) (77). However, under non-pathologic conditions intracellular accumulation of OH^{\cdot} is also limited because H_2O_2 is metabolized by glutathione peroxidase and/or catalase to form H_2O and O_2 . Thus, together with glutathione (GSH), SOD, glutathione peroxidase, and catalase are the major endogenous antioxidant enzyme systems responsible for limiting intracellular accumulation of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 during normal aerobic metabolism (78).

Nitric oxide synthase (NOS) has been shown to modulate levels of ROS in a variety of cells (79,80). There are

three isoforms of NOS: two are constitutively expressed (endothelial and neuronal; eNOS and nNOS, respectively) and one is an inducible isoform (iNOS). Nitric oxide (NO) generated by NOS can interact with $O_2^{\cdot-}$. This pathway for detoxification of $O_2^{\cdot-}$ does not result in the formation of H_2O_2 , making it a more benign decomposition pathway than SOD. However, one of the potential products of this reaction that has received a great deal of attention is peroxynitrite (ONOO \cdot), a potent oxidizing agent. ONOO \cdot has been implicated as the causative agent in a variety of pathologies (81-84). Alternatively, ONOO \cdot has been implicated as a protective agent (85-87). The latter can either spontaneously rearrange to form nitrate (NO $_3^-$) or undergo cleavage to generate OH-like radicals and nitrite (NO $_2^-$).

In ethanol binge drinking, Kupffer cells are primed for enhanced ROS release, due in part, to complement activation (71). Acute alcohol administration causes accumulation of reactive oxygen species, including $O_2^{\cdot-}$, OH \cdot , and H_2O_2 (88). Lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction have been detected in both animal models and humans receiving acute doses of alcohol (72-76,89,90). Acute ethanol administration also enhanced iNOS mRNA in hepatocytes and Kupffer cells (68). There is also a decrease in GSH levels along with an increase in glutathione disulfide (GSSG) levels (68,91). However, the effect of chronic ethanol consumption on hepatic GSH levels is complex, with reports of no change, decreases, or even increases (64,67,68,70,72-76,89,90,92,93).

Chronic ethanol consumption increases the cytosolic activity of iNOS and may increase $O_2^{\cdot-}$ production via activation or increasing the levels of CYP2E1, xanthine oxidase, NADPH oxidase, or damaged mitochondria, resulting in enhanced production of both NO and $O_2^{\cdot-}$. Dietary supplementation with phosphatidylcholine has been shown to attenuate ethanol-induced fibrosis acting as a 'sink' for free radicals (94).

Role of eicosanoids

Kupffer cells synthesize eicosanoids and are responsible for about 65% of the total amount of eicosanoids produced in the liver (95). Arachidonic acid (AA) can be released from the cell membrane by the action of phospholipase A $_2$ (PLA $_2$). This enzyme is activated by an increase in the intracellular Ca $^{2+}$ concentration, whereas higher intracellular cAMP levels inhibit PLA $_2$ (96). COX $_2$ catalyzes the conversion of arachidonic acid into prostaglandin H $_2$ (PGH $_2$), which is subsequently converted to other prostaglandins and thromboxanes, the so called *cyclooxygenase pathway* (97). COX $_2$ is induced by endotoxin, cytokines, and oxidative stress (98). Conversion of AA by LOX and subsequent enzymes leads to the production of leukotrienes, the so called *lipoxygenase pathway* (59).

Leukotrienes and prostaglandins are collectively called eicosanoids. The main product of Kupffer cells is prostaglandin D $_2$ (PGD $_2$), representing 55% of the total amount of eicosanoids produced by them (96). Kupffer cells lack the capacity to produce very potent leukotrienes (LT), like LTB $_4$ or LTC $_4$ (99). LPS is removed primarily by Kupffer cells that are activated, leading to rapid increases in COX $_2$ and intracellular Ca $^{2+}$, the latter of which, in turn, activates PLA $_2$ (96). Increased prostaglandin E $_2$ (PGE $_2$) causes triglycerides' accumulation in hepatocytes, and therefore, a state of steatosis (97). This pathway is one of many physiological processes involved in mechanisms of fatty liver caused by ethanol (100,101). Alterations of the hepatic metabolic state during binge drinking has been also attributed to the release of mediators such as prostaglandins from activated Kupffer cells, and this effect can be attenuated by the anti-thyroid drug, propylthiouracil (PTU) (94).

Role of cytokines and nuclear factor-kappa B (NF- κ B)

Production of inflammatory cytokines is a highly regulated process; regulation has been reported at the levels of transcription, translation, and secretion. Mechanistic studies have demonstrated that endotoxin binds to the LPS CD14/TLR $_4$ complex on Kupffer cells causing nuclear factor-kappa beta (NF- κ B) activation, which in turn leads to TNF- α production and liver injury (102-104). Increasing experimental evidence supports that TNF- α signaling, generates an increase in mitochondrial ROS generation in the hepatocyte through ubiquinone cycling via the electron transport chain (105-107).

Recent studies in rodents have confirmed a role of Kupffer cell-derived TNF- α in alcoholic liver injury (102) demonstrating increased immunostaining for TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-8 on bile duct epithelial cells and Kupffer cells (108).

In unstimulated cells, NF- κ B, a ubiquitous transcription factor, is sequestered in the cytoplasm with the I κ β family of inhibitors (59). On stimulation, I κ β is phosphorylated with subsequent release of NF- κ B. NF- κ B then translocates to the nucleus, in which it binds cis-acting elements in the promoter of target genes such as TNF- α and other proinflammatory cytokines (109).

Stimulation of macrophages with LPS activates tyrosine kinases, protein kinase C, NF- κ B, as well as members of the mitogen-activated protein kinase family including extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2), p38, and c-Jun kinase (JNK) (110). Chronic ethanol feeding differentially regulates the expression of TNF- α and IL-1 in Kupffer cells. These differential responses are associated with impaired LPS activation of NF- κ B counteracted by enhanced activation of ERK1/2 and early-immediate gene-1 (Egr-1) (111).

Dilinoleoylphosphatidylcholine (DLPC) decreases lipopolysaccharide-induced TNF- α generation by Kupffer cells of ethanol-fed rats by blocking p38, ERK1/2, and NF- κ B activation (112). DLPC also decreases TNF- α induction by acetaldehyde, a toxic metabolite released by ethanol oxidation (57). Iron has long been implicated in the pathogenesis of chronic liver disease, including ALD. It is believed that iron accumulates in chronic liver inflammation and catalyzes hydroxyl radical-mediated oxidative injury, activating the NF- κ B pathway (102).

Paracrine effects on hepatic stellate cells

Activated Kupffer cells release a number of soluble agents, including cytokines, such as transforming growth factor-beta (TGF- β), platelet-derived growth factor (PDGF), and TNF- α , ROS, and other factors (113). These factors act on hepatic stellate cells (HSC), which are localized in the parasinusoidal space, and store most of the vitamin A in the body (114).

In normal liver, the space of Disse contains a non electron-dense basement membrane-like matrix which is essential for maintaining the differentiated function of all resident liver cells. However, as the liver becomes fibrotic, the total content of collagens and non-collagenous components greatly increases and it is accompanied by a shift in the type of extracellular matrix in the subendothelial space from the normal low density basement membrane-like matrix to interstitial type matrix containing fibril-forming collagens.

Under normal conditions, HSC remain quiescent and produce small amounts of extracellular membrane (ECM), such as laminin and collagen type IV which are essential components of basement membrane (115). Upon exposure to soluble factors from damaged hepatocytes and from activated Kupffer cells, HSC will lose their lipid content (retinyl palmitate), and undergo morphological transition to myofibroblast-like cells (70,98, 116-121).

Activated HSC produce then large amounts of extracellular matrix components e.g. collagen I in an accelerated fashion, triggering a fibrogenic response (70,98, 116-121). During the cross-talk of both liver cell types, mediated by different cytokines, reactive oxygen species, and other soluble factors, hepatocellular damage is initiated, and subsequent establishment of liver fibrosis occurs.

In summary, a conceptual issue that has emerged in the field of ALD is the importance of cell-type specific research. It is well-known that Kupffer cells actively participate in the pathogenesis of ALD. The role of Kupffer cells in both the autocrine and paracrine mode of proinflammatory and cytotoxic actions has been supported by different experimental strategies. Among them, the development of co-culture models of Kupffer cells and HSCs for investigating the effects of various fibrogenic

mediators represents a promising tool for the study of ALD aiming at finding treatment strategies for this disease.

REFERENCES

1. Rojkind M. Extracellular matrix. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, editors. *The liver: biology and pathology*. New York: Raven Press; 1988. p. 707-16.
2. Wisse E, Knook DL, editors. *Kupffer cells and other liver sinusoidal cells*. Amsterdam: Elsevier/North Holland; 1977.
3. Kupffer CV. Ueber Sternzellen der Leber. *Arch Mikrosk Anat* 1876; 12: 353-8.
4. Wisse E. Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *J Ultrastruct Res* 1974; 46: 393-426.
5. Wisse E. Kupffer cell reactions in rat liver under various conditions as observed in the electron microscope. *J Ultrastruct Res* 1974; 46: 499-520.
6. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 16-28.
7. Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 1992; 46: 155-68.
8. Wake K, Decker K, Kim A, Knook DL, McCuskey RS, Bouwens L, et al. Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. *Int Rev Cytol* 1989; 118: 173-229.
9. Laskin DL, Weinberger B, Laskin JD. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 163-70.
10. Arii S, Imamura M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 40-8.
11. Decker K. The response of liver macrophages to inflammatory stimulation. *Keio J Med* 1998; 47: 1-9.
12. Sleyster EC, Knook DL. Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Lab Invest* 1982; 47: 484-90.
13. Braet F, Wisse E. Structural functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 2002; 23: 1.
14. Sleyster EC, Knook DL. Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Lab Invest* 1982; 47: 484-90.
15. Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non-hepatocytes in the rat liver parenchyma. *J Cell Biol* 1977; 72: 441-55.
16. Ramadori G, Dienes HP, Burger R, Meuer S, Rieder H. Expression of Ia-antigens on guinea pig Kupffer cells. Studies with monoclonal antibodies. *J Hepatol* 1986; 2: 208-17.
17. Lehrman MA, Hill RL. The binding of fructose-containing glycoproteins by hepatic lectins. *J Biol Chem* 1986; 261: 7419-25.
18. Kolb-Bachofen V, Schlepper-Schäfer J, Vogel W. Electron microscopic evidence for an asialoglycoprotein receptor on Kupffer cells: localization of lectin mediated endocytosis. *Cell* 1982; 29: 859-66.
19. Widmann JJ, Cotran RS, Fahimi HH. Mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells. Identification of two functional cell types in rat liver sinusoids by endogenous peroxidase activity. *J Cell Biol* 1972; 52: 159-70.
20. Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000; 106: 867-72.
21. Steinberg P, Schlemper B, Molitor E, Platt KL, Seidel A, Oesch F. Rat liver endothelial and Kupffer cell mediated mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxin B1. *Environ Health Perspect* 1990; 88: 71-6.
22. Koop DR, Chernosky A, Brass EP. Identification and induction of cytochrome P450 2E1 in rat Kupffer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 258: 1072-6.
23. Steinberg P, Schramm H, Schladt L, Robertson LW, Thomas H, Oesch F. The distribution, induction and isoenzyme profile of glutathione S transferase and glutathione peroxidase in isolated rat liver parenchymal, Kupffer and endothelial cells. *Biochem J* 1989; 264: 737-44.

24. Van Berkel TJC, Kruijt JK, Spanjer HH, Nagelkerke JF, Harkes L, Kempen HJM. The efficacy of a water-soluble tris-galactoside-terminated cholesterol derivative on the fate of low density lipoproteins and liposomes. *J Biol Chem* 1983; 260: 2694-9.
25. Ezekowitz RAB, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MYK, Warner A, Richards FF, et al. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 1991; 351: 155-8.
26. Harkes L, van Berkel TJC. Quantitative role of parenchymal and non-parenchymal liver cells in the uptake of ¹⁴C-sucrose labeled low-density lipoprotein in vivo. *Biochem J* 1984; 224: 21-7.
27. Van Berkel TJC, De Rijke YB, Kruijt JK. Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 2282-9.
28. De Rijke YB, Hessels EM, van Berkel TJC. Recognition sites on rat liver cells for oxidatively modified \tilde{A}_1 -very low density lipoproteins. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 41-9.
29. De Rijke YB, Jurgens G, Hessels EM, Hermann A, van Berkel TJC. In vivo fate and scavenger receptor recognition of oxidized lipoprotein[a] isoforms in rats. *J Lipid Res* 1992; 33: 1315-25.
30. Loegering DJ. Kupffer cell complement receptor clearance function and host defense. *Cir Shock* 1986; 20: 321-33.
31. Muro H, Shirasawa H, Maeda M, Nakamura S. Fc receptors of liver sinusoidal endothelium in normal rats and humans: a histological study with soluble immune complexes. *Gastroenterology* 1987; 83: 1078-85.
32. Rifai A, Mannik M. Clearance of circulating IgA immune complexes is mediated by a specific receptor on Kupffer cells in mice. *J Exp Med* 1984; 160: 125-37.
33. Sancho J, González E, Egido J. The importance of the Fc receptors for IgA in the recognition of IgA by mouse liver cells: its comparison with carbohydrate and secretory component receptors. *Immunology* 1986; 57: 31-42.
34. Steer CJ, Richman LK, Hague NE, Richman JA. Identification of receptors for immunoglobulin and complement on mouse Kupffer cells in vitro. *Gastroenterology* 1978; 75: 988-90.
35. Toth CA, Pohl D, Agnello V. Methods of detection of immune complexes by utilizing C1q or rheumatoid factors. In: Rose N, Friedman H, Fahey J, editors. *Manual of clinical laboratory immunology*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1986. p. 204-10.
36. Uwatakos S, Mannik M. The location of binding sites on C1q for DNA. *J Immunol* 1990; 144: 3484-8.
37. Peerschke E, Ghebrehiwet B. Platelet C1q receptor interactions with collagen and C1q coated surfaces. *J Immunol* 1990; 145: 2984-8.
38. Betz S, Isliker H. Antibody independent interaction between E. coli and human complement components. *J Immunol* 1981; 127: 1748-54.
39. Hinglais N, Kazatchkine MD, Mandet C, Appay MD, Bariety J. Human liver Kupffer cells express CR1, CR3, and CR4 complement receptor antigens. An immunohistochemical study. *Lab Invest* 1989; 61: 509-14.
40. Chao W, Liu H, DeBuysere M, Hanahan DJ, Olson MS. Identification of receptors for platelet activating factor in rat Kupffer cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 13591-8.
41. Thomas P, Zamcheck N. Role of the liver in clearance and excretion of circulating carcinoembryonic antigen (CEA). *Dig Dis Sci* 1983; 28: 216-24.
42. Thomas P, Petrick AT, Toth CA, Fox ES, Elting JJ, Steele G, Jr. A peptide sequence on carcinoembryonic antigen binds to a 80kD protein on Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 671-7.
43. Emlen W, Rifai A, Magilavy D, Mannik M. Hepatic binding of DNA is mediated by a receptor on nonparenchymal cells. *Am J Pathol* 1988; 133: 54-60.
44. Rous P, Beard JW. Selection with the magnet and cultivation of reticuloendothelial cells (Kupffer cells). *J Exp Med* 1934; 59: 577-91.
45. Anderson NG. The mass isolation of whole cells from rat liver. *Science* 1953; 117: 627-8.
46. Jacob ST, Bhargava PM. A new method for preparation of liver cell suspensions. *Exp Cell Res* 1962; 27: 453-67.
47. Rappaport K, Howze G. Dissociation of adult mouse liver by Na tetraphenyl boron: a potassium chelating agent. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 121: 1010-21.
48. St. George S, Friedman M, Byers SO. Mass separation of reticuloendothelial and parenchymal cells of rat's liver. *Science* 1954; 120: 463-4.
49. Berry MN, Friend DS. A high yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-20.
50. Seglen PO, Gjessing R. Effects of temperature and divalent cations on the substratum attachment of rat hepatocytes in vitro. *J Cell Sci* 1978; 34: 117-31.
51. Arahuetes RM, Sierra E, Codesal J, García-Barrutia MS, Arza E, Cubero J, et al. Optimization of the technique to isolate fetal hepatocytes and assessment of their functionality by transplantation. *Life Sciences* 2001; 68: 763-72.
52. Knook DL, Sleyster EC. Isolated parenchymal, Kupffer and endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 96: 250-7.
53. Smedsrod B, Pertoft H. Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of percoll centrifugation and selective adherence. *J Leuk Biol* 1985; 38: 213-30.
54. Brouwer A, De Leeuw AM, Praaning-van Dalen DP, Knook DL. Isolation and culture of sinusoidal liver cells: summary of a round table discussion. In: Knook DL, Wisse E, editors. *Sinusoidal liver cells*. Amsterdam: Elsevier/North Holland; 1982. p. 509-16.
55. Morin O, Patry P, Lafleur L. Heterogeneity of endothelial cells of adult rat liver as resolved by sedimentation velocity and flow cytometry. *J Cell Physiol* 1984; 119: 327-34.
56. Kesova IG, Ho YS, Thung S, Cederbaum AI. Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-superoxide dismutase. *Hepatology* 2003; 38: 1136-45.
57. Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases acetaldehyde-induced TNF-alpha generation in Kupffer cells of ethanol-fed rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 299: 459-64.
58. Nakamura Y, Yokoyama H, Higuchi S, Hara S, Kato S, Ishi H. Acetaldehyde accumulation suppresses Kupffer cell release of TNF-alpha and modifies acute hepatic inflammation in rats. *J Gastroenterol* 2004; 39: 140-7.
59. Nanji AA. Role of Kupffer cells in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002; 27: 13-5.
60. Fox ES, Cantrell CH, Leingang KA. Inhibition of the Kupffer cell inflammatory response by acute ethanol: NF-kappa B activation and subsequent cytokine production. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 5: 134-40.
61. Hijioka T, Goto M, Lemasters JJ, Thurman RG. Effect of short-term ethanol treatment on voltage-dependent calcium channels in Kupffer cells. *Hepatology* 1993; 18: 400-5.
62. Enomoto N, Ikejima K, Bradford B, Rivera C, Kono H, Brenner DA, et al. Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat kupffer cells via mechanism dependent on endotoxin. *Gastroenterology* 1998; 115: 443-51.
63. Shibayama Y, Asaka S, Nakata K. Endotoxin hepatotoxicity augmented by ethanol. *Exp Mol Pathol* 1991; 55: 196-202.
64. Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006; 46: S63-74.
65. Wu D, Cederbaum AI. Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207: 70-6.
66. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 277-84.
67. Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Anu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 27-42.
68. Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. Binge ethanol exposure increases liver injury in obese rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 1818-33.
69. Rojkind M, Domínguez-Rosales JA, Nieto N, Greenwel P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1872-91.
70. Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002; 35: 62-73.
71. Wheeler MD, Kono H, Yin M, Nakagami M, Uesugi T, Arteel GE,

- et al. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1544-9.
72. Kaplowitz N. Liver biology and pathobiology. *Hepatology* 2006; 43: S235-8.
 73. Han D, Matsumaru K, Rettori D, Kaplowitz N. Usonic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 439-51.
 74. Kaplowitz N. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 137-44.
 75. Fernández-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 263-73.
 76. Fernández-Checa JC. Alcohol-induced liver disease: when fat and oxidative stress meet. *Ann Hepatol* 2003; 2: 69-75.
 77. Granger DN, Grisham MB, Kvietys PR. Mechanisms of microvascular injury. In: Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobson ED, Walsh JH, editors. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press; 1994. p. 1693-722.
 78. Cepinskas G, Rui T, Kvietys PR. Interaction between reactive oxygen metabolites and nitric oxide in oxidant tolerance. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 4: 433-40.
 79. Grisham MB, Jourd'heuil D, Wink DA. Nitric oxide. I. Chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: G315-G321.
 80. Muriel P. Regulation of nitric oxide synthesis in the liver. *J Appl Toxicol* 2000; 20: 189-95.
 81. Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 2000; 350: 9-12.
 82. Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H. Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. *FEBS Lett* 1995; 363: 235-8.
 83. Rachmilewitz D, Stamler JS, Karmeli F, Mullins ME, Singel DJ, Loscalzo J, et al. Peroxynitrite-induced rat colitis—a new model of colonic inflammation. *Gastroenterology* 1993; 105: 1681-8.
 84. Oury TD, Piantadosi CA, Crapo JD. Cold-induced brain edema in mice. Involvement of extracellular superoxide dismutase and nitric oxide. *J Biol Chem* 1993; 268: 15394-8.
 85. Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green CJ, Motterlini R. Peroxynitrite induces haemoxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J* 1999; 339: 729-36.
 86. Lefer DJ, Scalia R, Campbell B, Nossuli T, Hayward R, Salamon M, et al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest* 1997; 99: 684-91.
 87. Naseem KM, Bruckdorfer KR. Hydrogen peroxide at low concentrations strongly enhances the inhibitory effect of nitric oxide on platelets. *Biochem J* 1995; 310: 149-53.
 88. Bautista AP. Acute ethanol binge followed by withdrawal regulates production of reactive oxygen species and cytokine-induced neutrophil chemoattractant and liver injury during reperfusion after hepatic ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 721-31.
 89. Coll O, Colell A, García-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology* 2003; 38: 692-702.
 90. Fernández-Checa JC. Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 9: 304: 471-9.
 91. Masini A, Ceccarelli D, Galesi D, Giovannini F, Trenti T. Lipid hydroperoxide induced mitochondrial dysfunction following acute ethanol intoxication in rats. The critical role for mitochondrial reduced glutathione. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 217-24.
 92. Shaw KP, Lieber CS. Depressed hepatic glutathione and increased diene conjugates in alcoholic liver disease. Evidence of lipid peroxidation. *Dig Dis Sci* 1983; 28: 585-9.
 93. Kawase T, Kato S, Lieber CS. Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 1989; 10: 815-21.
 94. Stewart SF, Day CP. The management of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2003; 38: 2-13.
 95. Kuiper J, Zijlstra FJ, Kamps JAAM, van Berkel TJC. Identification of prostaglandin D2 as the major eicosanoid from liver endothelial and Kupffer cells. *Biochim Biophys Acta* 1988; 959: 143-52.
 96. Caro AA, Cederbaum AI. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2- and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. *Free Rad Biol Med* 2006; 40: 364-75.
 97. Neyrinck AM, Margagliotti S, Gomez C, Delzenne NM. Kupffer cell-derived prostaglandin E2 is involved in regulation of lipid synthesis in rat liver tissue. *Cell Biochem Funct* 2004; 22: 327-32.
 98. Nieto N, Greenwel P, Friedman SL, Zhang F, Dannenberg AJ, Cederbaum AI. Ethanol and arachidonic acid increase alpha 2(I) collagen expression in rat hepatic stellate cells overexpressing cytochrome P450 2E1. Role of H2O2 and cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 20136-45.
 99. Ouwendijk RJ, Zijlstra FJ, van den Broek AM, Brouwer A, Wilson JH, Vincent JE. Comparison of the production of eicosanoids by human and rat peritoneal macrophages and rat Kupffer cells. *Prostaglandins* 1988; 35: 437-46.
 100. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34: 9-19.
 101. Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J* 2005; 19: 136-8.
 102. Tsukamoto H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 741-8.
 103. Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Gabele E, Wheeler MD, et al. Delivery of IkappaB superrepressor gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Hepatology* 2001; 34: 1149-57.
 104. Wheeler MD, Yamashina S, Froh M, Rusyn I, Thurman RG. Adenoviral gene delivery can inactivate Kupffer cells: role of oxidants in NF-kappaB activation and cytokine production. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 622-30.
 105. Zhou Z, Wang L, Song Z, Lambert JC, McClain CJ, Kang YJ. A critical involvement of oxidative stress in acute alcohol-induced hepatic TNF-alpha production. *Am J Pathol* 2003; 163: 1137-46.
 106. Lee FY, Li Y, Zhu H, Yang S, Lin HZ, Trush M, et al. Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice liver. *Hepatology* 1999; 29: 677-87.
 107. Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF-alpha. *EMBO J* 1993; 12: 3095-104.
 108. McClain CJ, Barve S, Barve S, Deaciuc I, Hill DB. Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 248S-52S.
 109. Jokelainen K, Thomas P, Lindros K, Nanji AA. Acetaldehyde inhibits NF-kappaB activation through IkappaBalpha preservation in rat Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 834-6.
 110. Fox ES, Leingang KA. Inhibition of LPS-mediated activation in rat Kupffer cells by N-acetylcysteine occurs subsequent to NF-kappaB translocation and requires protein synthesis. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 509-14.
 111. Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriaki H, Kawada N, et al. Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF-alpha/kallikrein-mediated activation of latent TGF-beta. *Gastroenterology* 2002; 123: 352-64.
 112. Cao Q, Mak KM, Lieber CS. DLPC and SAME combined prevent leptin-stimulated TIMP-1 production in LX-2 human hepatic stellate cells by inhibiting HO-mediated signal transduction. *Liver Int* 2006; 26: 221-31.
 113. Wu J, Kuncio GS, Zern MA. Human liver growth in fibrosis and cirrhosis. In: Strain AJ, Diehl AM, editors. *Liver growth and repair*. London: Chapman and Hall; 1998. p. 558-76.
 114. Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995; 22: S28-36.
 115. Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2000; 35: 665-72.
 116. Nieto N, Cederbaum AI. S-adenosylmethionine blocks collagen I production by preventing transforming growth factor-beta induc-

- tion of the COL1A2 promoter. *J Biol Chem* 2005; 280: 30963-74.
117. Gong P, Cederbaum AI, Nieto N. Increased expression of cytochrome P450 2E1 induces heme-oxygenase-1 through ERK MAPK pathway. *J Biol Chem* 2003; 278: 29693-700.
118. Nieto N, Cederbaum AI. Increased Sp1-dependent transactivation of the LAM gamma 1 promoter in hepatic stellate cells co-cultured with HepG2 cells overexpressing cytochrome P4502E1. *J Biol Chem* 2003; 278: 15360-72.
119. Nieto N, Mari M, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1 responsiveness in the promoter of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit. *Hepatology* 2003; 37: 96-106.
120. Nieto N, Domínguez-Rosales JA, Fontana L, Salazar A, Armendariz-Borunda J, Greenwel P, et al. Rat hepatic stellate cells contribute to the acute-phase response with increased expression of alpha1 (I) and alpha1(IV) collagens, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and matrix-metalloproteinase-2 messengerRNAs. *Hepatology* 2001; 3: 597-607.
121. Nieto N, Friedman SL, Greenwel P, Cederbaum AI. CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 30: 987-96.

Células de Kupffer y hepatopatía alcohólica

F. J. Cubero y N. Nieto

Departamento de Medicina. Unidad de Hepatología. Mount Sinai School of Medicine. Nueva York, EE.UU.

RESUMEN

Las hepatopatías son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Uno de los componentes esenciales de la compleja red que lleva al desarrollo de la hepatopatía alcohólica es la activación de las células de Kupffer por endotoxinas y otros mediadores solubles. El consumo de alcohol induce un estado de "escapes digestivos" que aumenta los niveles de endotoxinas en plasma e hígado. Cuando las células de Kupffer se activan, interactúan con un complejo de proteínas situado en la vía de señalización de las membranas extracelulares para producir toda una serie de factores solubles, como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metabolitos de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa y especies reactivas del oxígeno como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico, todos los cuales ejercen efectos paracrinós fisiológicamente diversos y fundamentales sobre todos los demás tipos de células del hígado, produciendo en última instancia la lesión hepática. Las células de Kupffer son también esenciales para la respuesta homeostática del hígado a las lesiones, ya que, al presentarse cambios celulares degenerativos, responden de inmediato a la agresión y liberan mediadores que orquestan las reacciones inflamatorias y reparadoras. Así, las respuestas homeostáticas comienzan por los mediadores que proceden de las células de Kupffer, que, a nivel celular, se encuentran en la base de los mecanismos de defensa y reparadores del hígado frente a las lesiones. Para poder comprender mejor el papel de las células de Kupffer en el inicio de la lesión hepática, se están empleando cultivos celulares (p. ej., co-cultivos) y modelos animales en los que dichas células de Kupffer se encuentran inactivadas. Es-

tos estudios están proporcionando resultados prometedores, ya que están contribuyendo a progresar en nuestros conocimientos sobre la hepatopatía alcohólica.

Palabras clave: Células de Kupffer. Hepatopatía alcohólica. Especies reactivas de oxígeno. Lipopolisacárido. Células estrelladas del hígado.

ABREVIATURAS (POR ORDEN ALFABÉTICO)

Hepatopatía alcohólica (HA); ácido araquidónico (AA); antígeno carcinoembrionario (ACE); c-Jun-cinasa (JNK); ciclooxigenasa (COX); dilinoleoilfosfatidilcolina (DLPC); gen precoz-inmediato 1 (Egr-1); endotoxina o lipopolisacárido (LPS); ácido etilenediamino-tetra-acético (EDTA); membrana extracelular (MEC); proteincinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2); glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); glutatión (GSH); glutatión disulfuro (GSSG); glutatión-S-transferasa (GST); células estrelladas del hígado (CEH); radical hidroxilo (OH[•]); leucotrienos (LT); lipooxigenasa (LOX); lipoproteína de baja densidad (LDL); proteína transportadora de LPS (LBP); complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); nitrato (NO₃⁻); óxido nítrico (NO); óxido-nítrico-sintasa (NOS); nitrito (NO₂⁻); factor nuclear kappa beta (NF-κB); citocromo P₄₅₀ 2E1 (CYP2E1); peroxinitrito (ONOO⁻); fosfolipasa A₂ (PLA₂); factor activador de plaquetas (PAF); factor de crecimiento derivado de las

Financiado por la beca US Public Health Service 1RO1 DK 069286-01A1 del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.

plaquetas (PDGF); propiltiouracilo (PTU); prostaglandina D₂ (PGD₂); prostaglandina E₂ (PGE₂); prostaglandina H₂ (PGH₂); especies reactivas de oxígeno (ROS); anión superóxido (O₂⁻); superóxido-dismutasa (SOD); factor transformador del crecimiento beta (TGF-β); receptor transmembranoso de tipo peaje (TLR); factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α); lipoproteína de muy baja densidad (VLDL).

ARQUITECTURA GENERAL DEL HÍGADO

En el hígado existen cinco tipos de células diferentes que ocupan alrededor del 80% del volumen hepático. El 20% restante del volumen hepático está formado por el espacio y la matriz extracelular. Entre las células del hígado, los hepatocitos son los de mayor tamaño y los más abundantes, ya que representan cerca del 50-60% del volumen hepático total y dos tercios del total de células hepáticas. Los otros cuatro tipos celulares se denominan células no parenquimatosas o de los sinusoides hepáticos. Su tamaño es más pequeño que el de las parenquimatosas y su número es menor (1).

Las células de los sinusoides hepáticos desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la función hepática en condiciones tanto fisiológicas como patológicas (2). Entre estas células figuran las células endoteliales, las células de Kupffer, las células estrelladas (células almacenadoras de grasa o células de Ito) y las células con hoyos (células NK). Esta revisión se centrará en el papel de las células de Kupffer.

CÉLULAS DE KUPFFER

Las células de Kupffer son macrófagos específicos del hígado: el primero que las identificó en este órgano fue von Kupffer (1876) (3). Se trata de células que tienen una forma ameboide y que se adhieren a la superficie de las células endoteliales de los sinusoides fenestrados. En el citosol de las células de Kupffer hay una serie de cuerpos densos y de vacuolas de diversos tamaños poco densas a los electrones, incluidos lisosomas. El citosol también contiene aparato de Golgi, vesículas recubiertas, vesículas de pinocitosis, ribosomas, centriolos, microfilamentos y microtúbulos (4). El núcleo de las células de Kupffer es ovoide o indentado, a veces lobulado (5). En la superficie de las células se observan estructuras vermiformes, un manto borroso, microvellosidades y pseudópodos que son componentes estructurales característicos de las células de Kupffer implicadas en los mecanismos endocíticos (6). Las células de Kupffer incorporan las partículas grandes, como eritrocitos y bacterias, por fagocitosis y las partículas pequeñas y moléculas mediante vesículas pinocitarias (7-12).

Se observa actividad de peroxidasa en el retículo endoplásmico rugoso, la envoltura nuclear y las membranas

fenestradas (13,14). La mayoría de las células de Kupffer muestran un patrón de peroxidasa endógena que es típico de los macrófagos tisulares residentes y se tiñen positivamente con marcadores macrofágicos tales como ED1, ED2 y Ki-M2R en las ratas y F4/80 en los ratones (6,15). Otros marcadores son la presencia de inducibilidad de los antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (16), de glucoproteínas de los receptores de fructosa y galactosa (17,18), de actividad de peroxidasa y de la capacidad de fagocitar partículas de látex marcadas con fluorescencia (19). Las células de Kupffer muestran elevada actividad de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), que desempeña un papel importante en la respuesta metabólica a la fagocitosis. Una enzima clave que aparece en las células de Kupffer es la NADPH-oxidasa, que interviene decisivamente en el desarrollo de la lesión hepática inducida por alcohol (20). Las enzimas del citocromo P₄₅₀, y concretamente la P₄₅₀2E1 (CYP2E1), se expresan también en las células de Kupffer. Además, la glutatión peroxidasa y varias isoformas de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) podrían capacitar a las células de Kupffer para desintoxicar sustancias potencialmente hepatotóxicas (21-23).

FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DE KUPFFER

Las células de Kupffer tienen muchas funciones específicas que resultan esenciales para la conservación de la homeostasis hepática en diversas circunstancias. La endocitosis, fundamental para mantener la homeostasis, no sólo es esencial para la obtención de varias proteínas (plasmáticas) y otros materiales hemáticos, sino que la captación de estas sustancias mediante receptores está directamente acoplada a una respuesta metabólica que lleva a la producción de citocinas y eicosanoides. Tanto las citocinas como los eicosanoides pueden actuar posteriormente de forma autocrina y/o paracrina.

El aclaramiento circulatorio de partículas con terminación galactosa se realiza mediante un receptor específico de galactosa que contienen las células de Kupffer (24). El receptor de manosa/N-acetilglucosamina está probablemente implicado en el aclaramiento de partículas mayores con manosa expuesta, como son microorganismos potencialmente peligrosos del tipo de las bacterias, las levaduras y los parásitos (25). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) las captan casi exclusivamente las células de Kupffer (26). Las células de Kupffer poseen un receptor adicional que se une a las LDL oxidadas, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y la lipoproteína A (27-29).

Como las células endoteliales, las células de Kupffer se unen a los complejos inmunitarios de IgG, lo que puede contribuir significativamente a la defensa del huésped normal (30,31). La captación de complejos inmunitarios de IgA está mediada por un receptor específico presente en las células de Kupffer que reconoce la porción Fc de la

IgA (32,33). En varias afecciones patológicas, como la cirrosis biliar primaria, la ictericia obstructiva y el consumo de etanol, la capacidad de las células de Kupffer para captar complejos inmunitarios de inmunoglobulinas se reduce, lo que puede llevar a reducir la capacidad de defensa del huésped. Las células de Kupffer poseen receptores para los componentes del complemento C1q y C3b (30, 34). Los factores del complemento se adhieren a las inmunoglobulinas (35), el ADN, las bacterias y las plaquetas (36-38). Las células de Kupffer humanas expresan también varios receptores del complemento y receptores CR1, CR3 y CR4, lo que confiere a las células de Kupffer una capacidad óptima para retirar de la circulación complejos recubiertos de complemento (39).

Los efectos del factor de activación de plaquetas (PAF) sobre el hígado están mediados por las células de Kupffer, ya que estas células poseen lugares de unión específicos para el PAF (40). El antígeno carcinoembrionario (ACE) es una glucoproteína procedente del tubo digestivo que las células de Kupffer retiran de la circulación (41). Estos lugares de unión podrían ser importantes para el desarrollo de metástasis hepáticas (42). Varios componentes celulares, como el ADN y las enzimas, son liberados en situaciones en las que mueren las células. El ADN puede retirarse de la circulación uniéndose a un receptor de las células de Kupffer sin opsonización (43).

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS DE KUPFFER

Uno de los primeros métodos desarrollados para aislar células de Kupffer se basaba en la captación *in vivo* de partículas de hierro por las mismas, la obtención de células de los sinusoides mediante lavado y la purificación de las células de Kupffer mediante imanes (44). Después se emplearon quelantes como el citrato, el tetrafenilborato o el ácido etilenediamínico-tetra-acético (EDTA) para preparar suspensiones de células hepáticas, aislándose las células de Kupffer cargadas de hierro mediante imanes (45-48). Estos métodos aportan cantidades pequeñas de células sinusoidales viables, mientras que seguía siendo un problema la contaminación por otras poblaciones celulares. Los procedimientos de aislamiento alternativos descritos por Berry y Friend (49) y Seglen y Gjessing (50) y modificados por Arahuetes y cols. (51) empleaban la colagenasa para la perfusión y dispersión del hígado. Se usaron para aislar simultáneamente las células parenquimatosas y no parenquimatosas de un mismo hígado. La pronasa, que destruye preferentemente las células hepáticas parenquimatosas, puede usarse para digerir el hígado directamente o puede emplearse además de la digestión por colagenasa.

Cuando la elutriación centrífuga se introdujo en el protocolo, el rendimiento fue mucho mayor, ya que se minimizó la contaminación de las fracciones de células endoteliales y de Kupffer por los linfocitos hemáticos y las

llamadas flictenas (52). Se han descrito gradientes de densidad de Percoll, seguidos de la adherencia selectiva de las células de Kupffer y endoteliales, con el fin de obtener fracciones celulares puras a partir de las suspensiones brutas de células hepáticas no parenquimatosas (53). El método de elección habitual para separar las células de Kupffer y endoteliales de las células estrelladas es la elutriación centrífuga tras un gradiente inicial en Histodenz o Nycodenz (54).

Finalmente, la separación mediante sedimentación por velocidad, que se basa en las mismas propiedades físicas que la elutriación, normalmente proporciona resultados menos satisfactorios a no ser que se empleen equipos de alta resolución. Además, disminuye la viabilidad de ambas fracciones celulares, ya que se precisan tiempos mayores (55). Estas células cultivadas siguen siendo capaces de fagocitar partículas coloidales de carbón y látex y pueden conservar sus funciones de tipo endocitótico durante al menos dos semanas de cultivo.

HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA (HA) Y CÉLULAS DE KUPFFER

Endotoxina

La hepatopatía alcohólica (HA) constituye una lesión hepática en la que pueden diferenciarse varias fases: esteatosis, esteatohepatitis alcohólica, hepatitis alcohólica y cirrosis (56). Las células de Kupffer desempeñan un papel importante en el daño hepático inducido por el alcohol. El alcohol aumenta la permeabilidad del tubo digestivo a la endotoxina o lipopolisacárido (LPS), uno de los elementos principales de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, que desencadena diversas reacciones inflamatorias, incluida la liberación de citocinas proinflamatorias y otros factores solubles (11). Adachi y colaboradores mostraron que la inactivación de las células de Kupffer mediante cloruro de gadolinio previene la aparición de las primeras lesiones hepáticas inducidas por el alcohol, observando una reducción simultánea de la inducción de la CYP2E1 por el etanol (57). También mostraron que la esterilización intestinal con antibióticos (polimixina B y neomicina) podía prevenir la lesión hepática inducida por alcohol al reducir las bacterias intestinales y disminuir el riesgo de endotoxemia (58).

En los mamíferos se han detectado múltiples receptores de LPS, incluidas dos glucoproteínas: LBP y CD14. La CD14 se une al complejo de la proteína transportadora de LPS (LPS-LBP), pero por sí misma no es capaz de iniciar la señal de activación a través de la membrana (6). Se ha postulado que los complejos LPS/CD14 interactúan con un receptor transmembranoso de tipo peaje (TLR) que sería el responsable de la transducción de señal (59).

Los datos tanto *in vivo* como *in vitro* indican que la exposición crónica al etanol sensibiliza a las células de Kupffer al menos frente a algunas de las respuestas me-

diadas por LPS. Por ejemplo, el consumo crónico de etanol aumenta la susceptibilidad de las ratas a la lesión hepática inducida por LPS (60). Hijioka y cols. mostraron que la ingesta de etanol en grandes cantidades inactivaba rápidamente los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje en las células de Kupffer, las cuales se activaban para liberar otros mediadores críticos (61). De esta forma, la inactivación de estos canales podría formar parte de los mecanismos por los que se produce la tolerancia rápida al etanol (62).

Shibayama y cols. mostraron que la administración aguda de etanol potenciaba la hepatotoxicidad por la endotoxina. En su trabajo, las células de Kupffer aisladas 24 horas después de la administración de etanol se habían sensibilizado al LPS, como reflejaban el mayor Ca^{2+} intracelular, la producción de factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) y los grandes aumentos de la CD14. Todos estos efectos se bloqueaban con antibióticos, lo que indica que la sensibilización de las células de Kupffer por el etanol está también mediada por el LPS procedente del tubo digestivo (63).

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el consumo de alcohol se ha señalado como uno de los mecanismos principales de la lesión hepática inducida por alcohol (56, 61-71). Las ROS pueden producirse por la acción de diversas enzimas, incluidas –aunque no exclusivamente– las enzimas CYP2E1, NADH/NADPH-oxidasa, xantina-oxidasa y las de las vías del araquidónico, como la lipooxigenasa (LOX) y la ciclooxigenasa (COX). La inducción de la producción de ROS también pueden desencadenarla las mitocondrias dañadas, como ocurre en la HA (72-76).

Las células de Kupffer contienen superóxido-dismutasa (SOD), que dismuta el $\text{O}_2^{\cdot-}$ (anión superóxido) para originar H_2O_2 . El H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ pueden interactuar mediante la reacción de Fenton para producir radicales más potentes y citotóxicos, como lo es el OH^{\cdot} (radical hidroxilo) (77). Sin embargo, en condiciones no patológicas, la acumulación intracelular de OH^{\cdot} se ve también limitada, pues el H_2O_2 se metaboliza por la glutatión-peroxidasa y/o la catalasa para generar H_2O y O_2 . Así, junto con el glutatión (GSH), la SOD, la glutatión-peroxidasa y la catalasa son los principales sistemas enzimáticos endógenos antioxidantes que limitan la acumulación intracelular de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 durante el metabolismo aeróbico normal (78).

Se ha observado que la óxido-nítrico-sintasa (NOS) modula los niveles de ROS en distintas células (79,80). La NOS tiene tres isoformas: dos se expresan de forma constitutiva (endotelial y neuronal; eNOS y nNOS, respectivamente) y la otra es una isoforma inducible (iNOS). El óxido nítrico (NO) generado por la NOS pue-

de interactuar con el $\text{O}_2^{\cdot-}$. Esta vía de desintoxicación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ no da lugar a la formación de H_2O_2 , lo que la convierte en una ruta de degradación más benigna que la de la SOD. Sin embargo, uno de los posibles productos de esta reacción, que ha despertado mucha atención, es el peroxinitrito (ONOO^{\cdot}), un potente oxidante. El ONOO^{\cdot} se ha visto implicado como agente causal en muchos procesos patológicos (81-84). Por otra parte, el ONOO^{\cdot} se ha visto implicado como agente protector (85-87). En este último caso puede recombinarse espontáneamente para dar nitrato (NO_3^-) o degradarse para producir radicales de tipo OH y nitrito (NO_2^{\cdot}).

Cuando se beben grandes cantidades de etanol, las células de Kupffer están preparadas para una mayor liberación de ROS, gracias en parte a la activación del complejo (71). La administración aguda de alcohol produce la acumulación de especies reactivas de oxígeno, tales como el $\text{O}_2^{\cdot-}$, el OH^{\cdot} y el H_2O_2 (88). Se han detectado lípidos peroxidados y disfunciones mitocondriales en modelos animales y seres humanos expuestos a dosis agudas de alcohol (72-76,89,90). La administración aguda de etanol aumenta también el ARNm de la iNOS en los hepatocitos y en las células de Kupffer (68). Se produce también una disminución de los niveles del GSH junto a un aumento de los niveles de glutatión disulfuro (GSSG) (68,91). Sin embargo, el efecto del consumo crónico de etanol sobre los niveles hepáticos de GSH es complejo, ya que se han publicado tanto la ausencia de cambios, como su disminución e incluso aumentos de su concentración hepática (64,67,68,70,72-76,89,90,92,93).

El consumo crónico de etanol aumenta la actividad de iNOS en el citosol y puede aumentar la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ mediante la activación o aumentando los niveles de CYP2E1, xantina-oxidasa, NADPH-oxidasa o mitocondrias dañadas, dando lugar a una mayor producción de NO y $\text{O}_2^{\cdot-}$. Se ha observado que los suplementos dietéticos de fosfatidilcolina atenúan la fibrosis inducida por etanol, actuando como "desagüe" para los radicales libres (94).

Papel de los eicosanoides

Las células de Kupffer sintetizan eicosanoides y son las responsables de alrededor del 65% del total de eicosanoides producidos por el hígado (95). El ácido araquidónico (AA) puede liberarse de la membrana celular por acción de la fosfolipasa A_2 (PLA_2). Esta enzima se activa al aumentar la concentración intracelular de Ca^{2+} , mientras que los niveles intracelulares aumentados de AMPc inhiben la PLA_2 (96). La COX_2 cataliza la conversión del ácido araquidónico en prostaglandina H_2 (PGH_2), la cual posteriormente se convierte en otras prostaglandinas y tromboxanos, la llamada *vía de la ciclooxigenasa* (97). La COX_2 es inducida por la endotoxina, las citocinas y el estrés oxidativo (98). La conversión del AA por la COX y otras enzimas posteriores lleva a la producción de leu-

cotrienos; es lo que se conoce por el nombre de la *vía de la lipooxigenasa* (59).

Los leucotrienos y las prostaglandinas se denominan eicosanoides. El principal producto de las células de Kupffer es la prostaglandina D₂ (PGD₂), que representa el 55% del total de eicosanoides producidos por dichas células (96). Las células de Kupffer carecen de capacidad para producir leucotrienos (LT) muy potentes, como LTB₄ o LTC₄ (99). El LPS es eliminado principalmente por las células de Kupffer activadas, lo que determina que se produzcan aumentos rápidos de la COX₂ y del Ca²⁺ intracelular y que este último a su vez active a la PLA₂ (96). El aumento de la prostaglandina E₂ (PGE₂) hace que se acumulen triglicéridos en los hepatocitos y que se produzca una esteatosis hepática (97). Se trata de una vía que forma parte de los numerosos procesos fisiológicos por los que el etanol provoca el hígado graso (100,101). Las alteraciones del estado metabólico hepático durante la ingesta de grandes cantidades de etanol se ha atribuido también a la liberación por las células de Kupffer de mediadores tales como las prostaglandinas. Este efecto puede atenuarse con el empleo del fármaco antitiroideo propiltiouracilo (PTU) (94).

Papel de las citocinas y del factor nuclear kappa B (NF-κB)

La producción de citocinas inflamatorias es un proceso que se encuentra regulado a diversos niveles, incluyendo tanto la transcripción, como de la traducción o de la secreción. Estudios mecanicistas han demostrado que la endotoxina se une al complejo LPS CD14/TLR4 de las células de Kupffer activando el factor nuclear kappa beta (NF-κB), lo que a su vez determina la producción de TNF-α y la lesión hepática (102-104). Cada vez contamos con más pruebas experimentales a favor de que la señalización del TNF-α aumenta la producción de ROS en las mitocondrias del hepatocito a través del ciclado de la ubiquinona por medio de la cadena de transporte de electrones (105-107).

Estudios recientes en roedores han confirmado que el TNF-α de las células de Kupffer interviene en la patogenia de la lesión hepática producida por el alcohol (102), ya que han demostrado una mayor inmunotinción del TNF-α, IL-1, IL-6 y la IL-8 en las células epiteliales de los conductos biliares y las células de Kupffer (108).

En las células sin estimular, el NF-κB, un factor de transcripción muy generalizado, se encuentra secuestrado en el citoplasma por la familia de inhibidores Iκβ (59). Durante la estimulación, el Iκβ se fosforila y se libera del NF-κB. Tras ello, el NF-κB se transloca al núcleo, donde se une a los elementos cis del promotor de genes diana tales como el del TNF-α y otras citocinas proinflamatorias (109).

La estimulación de los macrófagos con LPS activa las tirosina-cinasas, la proteína-cinasa C, el NF-κB y diver-

sos miembros de la familia de las proteína-cinasas activadas por mitógenos, como la proteína-cinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2), la p38 y la c-Jun-cinasa (JNK) (110). El consumo crónico de etanol regula diferencialmente la expresión de TNF-α e IL-1 en las células de Kupffer. Estas respuestas diferenciales se asocian a un deterioro de la activación del NF-κB por el LPS, lo que se contrarresta con una mayor activación de la ERK1/2 y del gen precoz-inmediato 1 (Egr-1) (111).

La dilinoleoilfosfatidilcolina (DLPC) reduce la producción de TNF-α inducida por el LPS en las células de Kupffer de las ratas alimentadas con etanol al bloquear la activación de p38, ERK1/2 y NF-κB (112). La DLPC reduce también la inducción del TNF-α por el acetaldehído, un metabolito tóxico producto de la oxidación del etanol (57). El hierro se ha venido implicando desde hace mucho tiempo en la patogenia de las hepatopatías crónicas, incluida la HA. Se cree que el hierro se acumula en la inflamación crónica del hígado, que cataliza la lesión oxidativa mediada por radicales hidroxilo y que activa la vía del NF-κB (102).

Efectos paracrinos sobre las células estrelladas del hígado

Las células de Kupffer activadas liberan una serie de agentes solubles, incluidas citocinas como el factor transformador del crecimiento beta (TGF-β), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el TNF-α, además de ROS y otros factores (113). Estos factores actúan sobre las células estrelladas del hígado (CEH), que se sitúan en el espacio parasinusoidal y almacenan la mayor parte de la vitamina A del organismo (114).

En el hígado normal, el espacio de Disse contiene una matriz electrodensa parecida a la membrana basal que es esencial para mantener la función diferenciada de todas las células residentes del hígado. Sin embargo, en la fibrosis hepática, el contenido total de colágenos y componentes no colagenosos aumenta enormemente y ello se acompaña de un cambio en el tipo de matriz extracelular que existe en el espacio subendotelial, el cual pasa de poseer un tipo parecido al de la membrana basal y densidad baja normal a un tipo intersticial que contiene colágenos fibrilares.

En condiciones normales, las CEH permanecen en reposo produciendo pequeñas cantidades de membrana extracelular (MEC), como la laminina y el colágeno del tipo IV, que son componentes esenciales de la membrana basal (115). Al exponerse a los factores solubles procedentes de los hepatocitos dañados y de las células de Kupffer activadas, las CEH pierden su contenido lípido (retinilpalmitato) y sufren una transición morfológica hacia células parecidas a los fibroblastos (70,98,116-121).

Las CEH activadas producen grandes cantidades de componentes de la matriz extracelular –p. ej., colágeno I– de forma acelerada, lo que se traduce en una reacción fi-

brogénica (70,98,116-121). Durante la intercomunicación de ambos tipos celulares hepáticos, mediada por distintas citocinas, especies reactivas de oxígeno y otros factores solubles, se inicia el daño hepatocelular que se sigue de fibrosis hepática.

En resumen, una cuestión conceptual que ha surgido en el campo de la HA es la importancia que tiene la investigación sobre los tipos celulares hepáticos. Es bien sabido que las células de Kupffer participan activamente

en la patogenia de la HA. El papel de las células de Kupffer en las acciones proinflamatorias y citotóxicas se ha visto respaldado por distintas estrategias experimentales. Entre ellas destaca el desarrollo de modelos de co-cultivo de células de Kupffer con CEH que permiten investigar los efectos de diversos mediadores fibrogénicos. Se trata de una herramienta prometedora para el estudio de la HA, ya que ello permitirá encontrar estrategias para el tratamiento de esta enfermedad.