

Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado

María I Schinoni, Raymundo Paraná

Acta Gastroenterol Latinoam 2006;36:211-217

Resumen

Apoptosis es un término griego que significa "caída de las hojas viejas de los árboles en otoño". Esta palabra describe el proceso por el cual células indeseables, dañadas o senescentes son eliminadas de los organismos multicelulares. La muerte celular patológica en el hígado fue siempre referida como necrosis, pero procesos fisiopatológicos en este órgano pueden conducir a injuria celular tanto por apoptosis como por necrosis. Apoptosis difiere de necrosis porque la primera es controlada activamente y la membrana celular es mantenida, evitando la extravasación de material intracelular con la consecuente respuesta inflamatoria. El proceso de apoptosis puede ocurrir por dos mecanismos: el de receptor de muerte (DR) o extrínseco o por el mecanismo mitocondrial llamado también intrínseco. Las células hepáticas expresan diferentes receptores de muerte: Fas, TNF-R1, TRAIL-R1 y TRAIL-R2. Las células estelares expresan Fas y TRAIL cuando están activadas y

transformadas fenotípicamente en miofibroblastos, y éstas también sufren apoptosis durante la resolución de la injuria hepática. Los colangiocitos parecen ser células tipo II (en éstas el mecanismo de apoptosis mitocondrial parece ser esencial). Apoptosis mediada por estos receptores juega un rol importante en una variedad de procesos biológicos tales como el daño tisular, protección contra microorganismos patógenos, y su papel central en la injuria hepática y posterior progresión a la fibrosis ha sido bien establecido en diferentes enfermedades hepáticas. Un factor importante en apoptosis celular es que puede ocurrir en ausencia de elevación sérica de transaminasas hepáticas como ocurre en la necrosis celular. Este artículo es una revisión de este proceso.

Summary

Apoptosis and progression of hepatic fibrosis in liver diseases

Apoptosis is a Greek term that means "the fall of the old leaves of the autumn trees". This term describes the process by which undesirable, damaged or old cells are eliminated from the multicellular organisms. Pathologic cell death in the liver has traditionally been referred to as necrosis, but pathophysiologic process in the liver can lead to cell injury and death by apoptosis as well by necrosis. The first differs from the second, because it is actively controlled and the membrane integrity is maintained, avoiding extravasations of intracellular mate-

Hospital Universitario Edgard Santos - Instituto de Ciências y Salud - Universidad Federal de Bahía, Brasil.

Correspondencia: María Isabel Schinoni
Av Juracy Magalhães Jr 2096 Sala 510
Salvador-BA 41920.000, Brasil
Teléfono: 55-71.3642064 / Fax: 55-71.3350-4651
E-mail: misabelschinoni@terra.com.br
clicopia: unif@svn.com.br

Abreviaturas: DR: Death Receptor (receptor de muerte); TNF-R1 Tumor Necrosis Factor Receptor (Receptor Del Factor de Necrosis Tumoral); TRAIL: Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (Ligando inductor de apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral); HCS: Stellate cell (célula estelar); TRAIL-R 1, 2: Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor. Receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral); FasL: Fas Ligand (Ligando de Fas); DNA: Dextran-biotinylated dextran sulfate (Ácido desoxirribonucleico); NK: Natural Killer (Células Asesinas); OPP: osteoprotegerine; FADD: Fas associated death domain (Dominio de muerte asociado a Fas); TRADD: Tumor Necrosis Factor Receptor associated death domain (Receptor del Factor de Necrosis Tumoral Asociado con el Dominio de Muerte); DISC: Death Inducing Signaling Complex (Complejo de Inducción de la Señalización de Muerte); RIP: Receptor Interacting Protein (Receptor de la Proteína Inter-actuante); TRAF: Tumor Necrosis Factor- Receptor Associated Factor 2 (Receptor asociado al Factor 2 de Necrosis Tumoral); NF- κ B: Nuclear Factor κ Transcripcional Beta (Factor nuclear transcripcional Beta); NIK: Nuclear Factor κ Transcripcional Beta Protein Kinase (Proteína quinasa del Factor nuclear transcripcional Beta); I κ B α : Fosforilatación de la proteína nuclear transcripcional Beta (Proteína fosforilada del factor nuclear transcripcional Beta); TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediate UTP end labelling (Marcación de la UTP final mediada por la transferasa desoxinucleotidil terminal). TGF Beta: Transforming Grow Factor (Factor Transformador de Crecimiento Beta); mRNA: messenger Ribonucleic Acid (mensajero del Ácido Ribonucleico); PARP: Poly ADP Ribose Polymerase (Polimerasa de poli Adenosina Difosfato Ribosa).

rial and inflammatory response. Apoptosis can occur by two mechanisms: death receptor (DR) or extrinsic mechanism and mitochondrial or intrinsic mechanism. Liver cells express different death receptors: hepatocytes express Fas, TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-R2; Stellate Cell (HCS) express Fas and TRAIL when is activated into myofibroblast-like phenotype and undergo apoptosis during resolution of liver injury in vivo. Cholangiocytes seem to be type II cells (in which the mitochondrial mechanism to apoptotic is essential) regarding signaling of Fas endothelial cells from rat livers express Fas, and their activation may lead to apoptosis of endothelial cells from hepatic sinusoids. Apoptosis mediated by these receptors have a major role in a variety of biological processes as tissue injury, protection against pathogenic microorganisms, and the role on hepatic injury and posterior progression to fibrosis has been well established in different hepatic diseases. Apoptosis may occur in the absence of significant transaminase elevations as happen in cellular necrosis. This paper is a review of this process.

Index (Key words): Apoptosis; Liver fibrosis and disease.

Apoptosis y enfermedades del hígado

En los últimos años se está discutiendo la importancia del proceso de apoptosis en varios tejidos y su rol en la patogénesis de diferentes enfermedades. Apoptosis es una palabra que deriva del griego y cuyo término significa “la caída de hojas viejas de los árboles en otoño”. Este término describe el proceso por el cual células dañadas o senescentes son eliminadas de los organismos multicelulares. En el hígado este fenómeno fue descrito por Kerr en 1970 durante un estudio en el cual relató la atrofia del órgano después de la ligadura de la vena porta seguido por un proceso de condensación y fragmentación celular, así como de separación de las células, vecinas.¹

A través del proceso de apoptosis las células se encogen y se separan de las demás. Hay una invaginación del citoplasma que se transforma en una ampolla y fagocita las organelas intactas. Al mismo tiempo, el núcleo es fragmentado. La célula desintegrada y sus membranas reciben el nombre de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células vecinas o por fagocitos tales como la célula de Kupffer en el hígado.

El proceso de apoptosis se encuentra activamente controlado, en él es mantenida la integridad de las membranas evitando la extravasación del material intracelular y la consecuente respuesta inflamatoria. Estas características lo diferencian del proceso de necrosis celular.²

Fisiopatogenia de la apoptosis

El proceso de apoptosis puede ocurrir por dos mecanismos: 1- receptor de muerte o extrínseco y 2- mitocondrial o intrínseco. El primer mecanismo involucra la unión u oligomerización de los receptores de muerte en la superficie celular que disparan el proceso de apoptosis. Las células hepáticas probablemente expresan estos receptores como mecanismo para erradicar virus hepatotróficos. Los inmunocitos utilizan apoptosis para erradicar las células infectadas. Estos receptores en la superficie celular pertenecen a una superfamilia de una citoquina llamada Factor de Necrosis Tumoral. Estos receptores se encuentran expresados en muchos tejidos y células, incluyendo, como ya fue relatado, el hígado. Últimamente fue demostrado que la apoptosis mediada por estos receptores tiene un rol importante en una variedad de procesos biológicos como injuria de tejidos, homeostasis inmunológica y protección contra microorganismos patógenos.³

En contraste, el mecanismo mitocondrial es disparado por diferentes respuestas al estrés intracelular: lesión en el DNA, cambios en las concentraciones de calcio intracelular y estrés endoplasmático.³ La disfunción mitocondrial juega un papel crítico en la expansión del proceso de apoptosis, integrando el inicio de la muerte celular por receptor (DR) y el de la señal de estrés en una vía final común a ambos mecanismos. La liberación mitocondrial del citocromo C es un evento constante en la apoptosis y desencadena la cascada de muerte celular dependiente de las enzimas caspasas, culminando en la fragmentación celular.^{4,5}

Receptores de muerte celulares

Fueron identificados 6 tipos de receptores celulares:

1- Receptor de FAS o CD 95: es una proteína de la superficie celular con un peso molecular de 42-52 kDA. Éste promueve apoptosis después de unirse a un ligando inactivado (FasL), una proteína de membrana con una estructura homotrimérica, la

cual es expresada en la superficie de células T y en Células Asesinas (NK), actuando como un efector de las células citotóxicas para remover células cancerosas o infectadas con virus. El funcionamiento defectuoso del sistema Fas lleva a hiperplasia de los órganos linfáticos y del hígado, acelerando enfermedades autoinmunes y génesis tumoral, mientras que la exacerbación de este sistema conduce a destrucción tisular masiva. Fue demostrado que el sistema Fas está involucrado en el recambio de los hepatocitos senescentes.²

2- Receptores 1 y 2 del Factor de Necrosis Tumoral. (TNF-R1 y TNF R2): Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-alfa) es una citokina pleomórfica expresada como una proteína de transmembrana tipo II con una estructura homotrimérica. Está presente principalmente en macrófagos, incluyendo células de Kupffer, monocitos y células T, actúa en respuesta a infecciones y en condiciones de inflamación tisular. Se encuentra también en células B, fibroblastos y hepatocitos. Se liga a dos receptores diferentes: TNF-R1 y TNF-R2, pero solo el primero tiene un dominio de muerte intracelular, siendo el único mediador de la señalización de apoptosis de esta citokina.³

3. Receptor 1 ligando inductor de TNF (TRAIL-R1), también referido como receptor de muerte 4 (DR) 4. Receptor 2 ligando inductor de TNF (TRAIL-R2) también llamado receptor de la muerte 5 (DR5). TRAIL o/APO-2 es otra proteína transmembrana tipo II que puede convertirse en una forma soluble cuando es clivada. Ésta es capaz de unirse a 5 diferentes receptores: TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 también llamado (TRID), TRAIL-R4 y el receptor soluble de osteoprotegerina (OPG). De todos estos solamente TRAIL-R1 y TRAIL-R2 contienen un dominio de muerte endoplasmático que transmite la señal de apoptosis.^{1,3}

5. Receptor: DR3 conocido como Apo3 o TRAMP y 6. Receptor: 6 (DR6).

Entre los mencionados, solo Fas, TNF-R1, TRAIL-R1 y R2 son los que participan del mecanismo de apoptosis en el hígado. La porción endoplasmática de estos polipéptidos contiene una secuencia de entre 60 y 80 aminoácidos referida como dominio de muerte que se liga a proteínas específicas adaptadoras que transmiten un código para conectarse y activar a caspasa, una proteasa que inicia la cascada de apoptosis.^{6,7,8}

Señalización de apoptosis por los receptores de muerte

Cuando el ligante de Fas (Fas/L) se liga a Fas y TNF se une al receptor TNF-R1, las moléculas individuales se trimerizan y agrupan, conduciendo a la unión de los dominios de muerte. Este re-agrupamiento permite al dominio de Fas unirse al adaptador presente en el citoplasma originando la nueva forma de Fas asociado al dominio de la muerte (FADD), así como el receptor de TNF asociado al dominio de muerte (TRADD), el cual se liga a FADD. Después se une a un cimógeno endoplasmático conocido como pro-caspasa 8 transformada en caspasa 8 a través de una división proteolítica.¹ Esta es una enzima sintetizada como una pro-enzima inactiva que cuando es procesada proteolíticamente constituye un complejo activo muy importante iniciador y amplificador de la señalización intracelular de apoptosis. Fue demostrado que caspasa tiene un rol destacado en varias enfermedades hepáticas.^{6,7,8,9}

El complejo (FADD) más la caspasa 8 está indicado como el complejo de inducción de la señalización de muerte, *death inducing signaling complex*, (DISC).^{1,3} Fue demostrado que el bloqueo del mismo puede conducir a inhibición de apoptosis.⁶

Cuando TNF-R1 se une al TNF, éste se trimeriza permitiendo la formación de TRADD, el cual se asocia al dominio de muerte y sirve como plataforma para unir varias moléculas incluyendo: FADD, TNF-R (TRAF-2) y al receptor inter-actuante proteico (RIP). La unión de RIP y TRAF promueve la transcripción de factores que conducen a la activación de genes que se oponen a la apoptosis. El mecanismo es el siguiente: cuando RIP y TRAF se unen a los receptores de muerte, se activa una proteína-quinasa del Factor Nuclear Transcripcional NF- κ B (NIK) el cual activa el complejo catalítico I κ B kinase (IKK) conduciendo a la fosforilación de la proteína del factor NF- κ B, conocida como I κ B α que inhibe a este factor. Indudablemente, la inhibición de NF- κ B sensibiliza a las células para apoptosis inducidas por TNF-alfa.³ Este factor nuclear transcripcional, NF- κ B, es requerido para la activación del linfocito, proliferación y expresión de varias citokinas. Éste es rápidamente activado por un amplio espectro de patógenos virales y microbianos, siendo su papel principal mantener la perpetuación del ciclo celular e inhibir la apoptosis.

Proteínas reguladoras de apoptosis

Existe una familia de diversas proteínas que actúan regulando el proceso de apoptosis en seres humanos. El prototipo de ésta es Bcl-2, 15. Miembros de esta familia fueron identificados, actuando algunos como anti-apoptosis; Bcl-2, Bcl-Xl y otros promoviendo este proceso: Bax, Bad y Bid. La proporción entre estos dos grupos determina la susceptibilidad para muerte celular o para supervivencia, como ocurre con la sobre-expresión de las proteínas anti-apoptóticas en ciertos tumores.²

Existen otras familia de proteínas inhibidoras de apoptosis llamadas IAPs, éstas regulan la vía citocromo-caspasa. Existen 3 tipos en humanos: XIAP, c-IAP 1 y c-IAP 2 que se unirían a caspasa 9 previniendo su activación.³

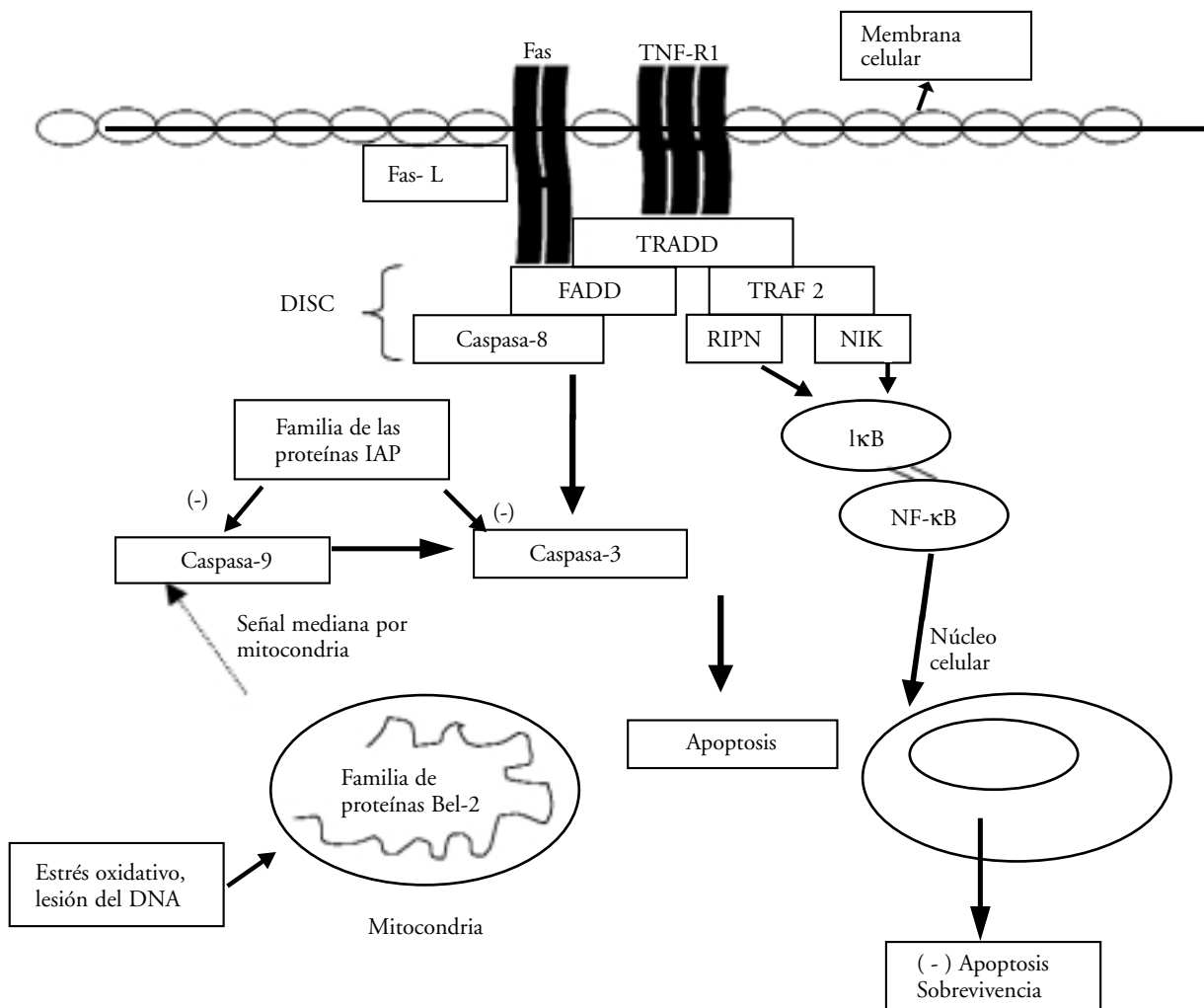
Apoptosis en diversas células hepáticas

Estas células expresan Fas, TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-R2. El papel de Fas y TNF-R1 en apoptosis fue bien establecido en un estudio en el que se demostró hepatotoxicidad cuando se utilizaron anticuerpos anti Fas o anti TNF-alfa *in vitro* y *in vivo*.⁹ A diferencia de estos dos últimos mencionados, el potencial hepatotóxico de TRAIL es polémico. Parece que jugaría un rol menos significativo en la señalización de apoptosis, pero su expresión podría inducir daño del DNA.^{3,10}

Apoptosis en células estelares

La célula estelar o de Ito pertenece al tipo de célula del mesénquima que reside entre las sinusoides hepáticas, y tiene un papel central en inflamación y

Figura 1. Esquema de la señalización de apoptosis por el mecanismo de receptores de muerte celular y por el mecanismo mitocondrial, (adaptado de Schoemaker 2004).



fibrosis hepática. Estas células pueden migrar en respuesta a la liberación de citokinas por monocitos y segregar una serie de citokinas y quimokinas que podrían participar en la activación de células de la serie blanca, amplificando la respuesta inflamatoria. Estas células se encuentran habitualmente inactivadas y participan del metabolismo de la vitamina A. Sin embargo, ante diferentes estímulos, éstas son activadas y al hacerlo cambian su patrón de expresión genotípica y fenotípica. Estos cambios en la función celular son análogos a los de la célula T y dendríticas. Probablemente la susceptibilidad para apoptosis mediada por los receptores de la muerte (DR) cambia de acuerdo a su estado inactivo o activo. Fue demostrado que el cultivo de estas células resiste a la apoptosis mediada por Fas cuando están inactivas, sin embargo, cuando son activadas por diferentes estímulos, se transforman susceptibles a apoptosis por TRAIL.^{3,11}

Apoptosis en colangiocitos

Éstos parecen ser del tipo de células tipo II en las cuales el mecanismo de apoptosis esencial es el mitocondrial, similar a la señalización por Fas. Un estudio utilizando agonistas anti Fas demostró apoptosis en estas células.³

Apoptosis en células de Kupffer

La apoptosis mediada por receptores de muerte está aún siendo estudiada en estas células. Éstas actuarían como reguladoras del proceso de apoptosis en otras células más que sufriendo este proceso.³

Apoptosis en células endoteliales

Las células endoteliales de hígado de ratones expresan Fas y su activación puede conducir a apoptosis de células endoteliales murinas desde las sinusoides hepáticas. Aunque estas células son más resistentes a la regulación de Fas que los hepatocitos, el tratamiento con TNF induce una fuerte regulación del mismo e incrementa la susceptibilidad pro-apoptosis de esta citosina.^{3,12}

Apoptosis en diversas enfermedades hepáticas. Enfermedad hepática por alcohol

El papel del alcohol en la progresión de diferentes enfermedades hepáticas fue demostrado en varios trabajos. Apoptosis es una lesión común en la enfer-

medad alcohólica del hígado y los hepatocitos que contienen corpúsculos de Mallory podrían ser eliminados por este mecanismo.¹⁰ Los estímulos para inducción de apoptosis mediado por alcohol son probablemente multifactoriales, incluyendo estrés oxidativo, aumento de la peroxidación lipídica y sensibilización para receptores de muerte celular como TNF y Fas. Fue relatado que el alcohol podría sensibilizar a los hepatocitos para apoptosis mediada por el TNF-alfa, disminuyendo la hormona estimulante de glutatona (GHS).¹³

Apoptosis podría ser el mecanismo por el cual el hígado intenta remover células infectadas. Fue demostrado también una exacerbación de este proceso cuando existe virus asociado al alcohol.¹¹

En la enfermedad alcohólica hepática fue demostrado que la expresión de FasL en los hepatocitos podría inducir apoptosis en los hepatocitos vecinos que expresan Fas. Este mecanismo fue llamado "*fratricidio*".³

Enfermedad colestásica del hígado

En la colestasis, cuando existe un deterioro de la secreción biliar, los ácidos biliares tóxicos inducen apoptosis e injuria hepatocelular vía Fas y también independientemente de éste a través de la señalización por los receptores TRAIL1/TRAIL2.^{3,12}

Enfermedad de Wilson

Células apoptósicas son comúnmente encontradas en esta enfermedad. La señal puede ser activada por estrés oxidativo generado por sobrecarga de cobre en el hepatocito. Esto último, induciría a expresión de Fas y FasL, promoviendo *fratricidio* de las células vecinas como fue relatado con la enfermedad alcohólica.^{3,10}

Regeneración hepática

El hígado tiene la peculiaridad como tejido en contar con mecanismos propios para regenerarse en respuesta a una amplia gama de estímulos, incluyendo agentes tóxicos, hepatectomía parcial y otros mitógenos. El proceso de apoptosis, el cual es regulado por genes e inducido rápidamente después de hepatectomía, cumple un importante rol en la proliferación celular y restauración hepática. Los cambios de transcripción y traslación de proteínas endoplasmáticas anti y pro-apoptóticas de la familia Bcl-

2/ Bax fueron identificados durante la regeneración hepática.² Esta depende del TNF-alfa. Una interferencia inducida por TNF-alfa en la activación del factor transcripcional NF-κB dificulta la regeneración y promueve apoptosis. Esta regeneración que se continúa por la síntesis de DNA es un estímulo para apoptosis controlada por agentes regulatorios de sobrevivencia.^{1,14}

Apoptosis y fibrosis hepática

Siendo la apoptosis el primer paso de lesión hepática y la fibrosis la respuesta final de las células estelares a este proceso, es atractivo especular una relación directa entre los dos procesos. Fibrosis es uno de los mejores parámetros para evaluar correctamente la progresión de enfermedad hepática porque se correlaciona con la evolución hacia cirrosis. El proceso de apoptosis finaliza con la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son limpiados desde los tejidos por fagocitosis. Este último mecanismo es necesario para proteger al tejido del daño causado por la liberación de material pro-inflamatorio de estos cuerpos. El macrófago que fagocita los cuerpos apoptóticos *in vitro* inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias liberadas por éstos, siendo la más estudiada el Factor Transformador de Crecimiento Beta (TGF β).¹³ Las células epiteliales y también los fibroblastos pueden participar en este proceso. Las células estelares se encuentran ubicadas cerca de los hepatocitos en una localización estratégica para fagocitar los cuerpos apoptóticos generados por los hepatocitos muertos. Si la producción de TGF-alfa está aumentada en las células estelares, una respuesta pro-fibrogénica es generada en el hígado. Ensayos clínicos demostraron que la célula estelar engloba los cuerpos apoptóticos y que la incubación con los mismos estimulará la expresión de TGF-alfa y mRNA de colágeno Ia, que es el mayor constituyente de la cicatriz fibrosa.⁴ Estas observaciones sugieren fuertemente que el proceso de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por esta célula puede ser un mecanismo potencial para correlacionar lesión hepática con fibrosis. Como ya fue mencionado, después de ocurrir daño hepático, la célula estelar sufre modificaciones fenotípicas y morfológicas resultando en su activación y deposición de matriz colágena: después de esta activación, sufre apoptosis.¹⁵ Una ligación directa entre acumulación de mediadores inflamatorios y apoptosis fue

relatado. Primero, el proceso de muerte celular no controlado en condiciones patológicas puede alterar la integridad del hepatocito y cuando la magnitud de este proceso sobrepasa la capacidad del hígado de limpiar estos restos celulares, los cuerpos apoptóticos sufren disrupción espontánea derramando su contenido inflamatorio, lesionando los tejidos. Fue demostrado que la apoptosis del hepatocito es un estímulo importante para la extravasación de neutrófilos vía receptores de muerte. Finalmente, la fagocitosis de los neutrófilos muertos por los macrófagos y por las células de Kupffer puede inducir expresión de ligandos de los receptores de muerte, especialmente de Fas, acelerando la apoptosis celular.⁴

Estudio de apoptosis en el tejido hepático

Existen una variedad de técnicas para identificar apoptosis en tejidos *in vitro*. Los métodos de identificar hepatocitos apoptóticos son limitados ya que éstos son rápidamente fagocitados por los macrófagos adyacentes. El método más simple consiste en el conteo manual de estos cuerpos apoptóticos teñidos con Hematoxilina y Eosina. En un estudio utilizando este método fueron identificados dos tipos de estos cuerpos en el hígado: cuerpos acidófilos esféricos localizados fuera de los hepatocitos adyacentes llamados habitualmente Cuerpos de Councilman y cuerpos acidófilos con forma estrellada aguda, los cuales estaban retraídos todavía unidos a los hepatocitos. El núcleo de estos cuerpos apoptóticos puede encontrarse picnótico, fragmentado o ausente.^{15,16}

Técnica del túnel

Existe una técnica llamada TÚNEL, la cual demuestra la división del DNA *in situ*. Durante apoptosis, la fragmentación del DNA conduce a un aumento de números de los 3 hidroxilos libres finales del mismo. El acto de transferencia del desoxinucleótido mediante la desoxiuridina trifosfato (dUTP), es llamada técnica del TÚNEL. Ésta tiene el inconveniente de confundir necrosis con apoptosis de acuerdo a la técnica utilizada para marcar las células apoptóticas. El número de células marcadas depende de las condiciones experimentales utilizadas, por lo que es necesario utilizar técnicas morfológicas de identificación nuclear específicas para el éxito de esta técnica. Utilizando tinción con DAPI

que liga fluoresceína al núcleo, los cambios en el mismo, como condensación y marginación de la cromatina que ocurren durante apoptosis pueden ser identificados por microscopia fluorescente, detectando este proceso en células aisladas y tejidos. Basado en este mismo concepto puede también ser medido por citometría de flujo usando ácido nucleico ligado a un marcador fluorescente. Existen una variedad de marcas comerciales ya listas para medir apoptosis. Para material de biopsia hepática fijada en formol el mejor método es *Apoptag in situ* (kit de detección de apoptosis), el cual detecta fragmentación del DNA a través de la técnica del TÚNEL (asociando DNA fragmentado con morfología definitiva de apoptosis).²

Técnica de la anexina V

Es otra técnica utilizada para detectar apoptosis. La fosfatidilserina, una enzima presente en la parte externa de la membrana plasmática en el momento inicial de apoptosis puede ser identificada por este método, y tiene la desventaja de ser una técnica no cuantitativa.²

Técnica de caspasa

Caspasa es una familia de enzimas que comienzan la señal de apoptosis. Éstas son secretadas como zimógenos de caspasa 8 y 3, siendo activadas en secuencia como 8 y 9, siendo éstas las que disparan la activación de la caspasa efectora 3, 6 y 7. Esta activación lleva a la unión de las mismas a un sustrato llamado PARP (polimerasa de poli Adenosina Difosfato ribosa). Métodos de inmuno-histoquímica permiten el estudio de las diferentes caspasas, principalmente la 3, identificando células apoptóticas en el estadio más temprano de este proceso. Esta técnica está siendo muy utilizada en estudios de hepatitis C en los cuales se correlaciona apoptosis con infiltrado inflamatorio.^{7,17,18}

Referencias

1. Kaplowitz N. Hepatology: A century of progress. Cell death at the millennium. Clinics in Liver Disease 2000; 4:257-268.
2. Patel T. Apoptosis en hepatic pathophysiology. Clinics in Liver Disease 2000;4:295-317.
3. Yoon J.H, Gores G. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. Journal of Hepatology 2002;37:400-410.
4. Canbay A, Friedman S, Gores G. Apoptosis: The nexus of liver injury and Fibrosis. Hepatology. 2004;39:273-278.
5. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998;281:1309-1312.
6. Seino K, Setoguchi Y, Ogino T, Kayagaki N, Akiba H, Nakano H, Taniguchi H, Takada Y, Yuzawa K, Todoroki T, Fukuchi Y, Yagita H, Okumura K, Fukao K. Protection against Fas-mediated and tumor necrosis factor receptor 1-mediated liver injury by blockade of FADD without loss of nuclear factor-kappa B activation. Annals of Surgery 2001; 234:681-688.
7. Bantel H, Luger A, Poremba C, Bantel H, Luger A, Poremba C, Luger N, Held J, Domschke W, Schulze-Osthoff K. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in Chronic Hepatitis C Virus infection. Hepatology 2001;34:758-767.
8. Prikod "ko E, Prikod" ko G, Siegel R, Thompson P, Major M, Cohen J. The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its proteases or helicases activities. Virology 2004;329:53-67.
9. Ogasawara K, Hida S, Azimi N, Ogasawara K, Hida S, Azimi N, Tagaya Y, Sato T, Yokochi-Fukuda T, Waldmann TA, Taniguchi T, Taki S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature 1998; 391:700-703.
10. Nanji, A. Apoptosis and alcoholic liver disease. Seminars in Liver Disease 1998;18:187-190.
11. Pianko S, Patella S, Ostapowicz G, Desmond P, Sievert, W. Fas-mediated hepatocyte apoptosis is increased by hepatitis C virus infection and alcohol consumption, and may be associated with hepatic fibrosis: mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis C virus infection. Journal of Viral Hepatitis 2001;8:406-413.
12. Higuchi H, Bronk S.F, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail receptor 2/ Dr 5 expression and apoptosis. The Journal of Biological Chemistry 2001;276 :38610-38618.
13. Fadok V.A., Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/ paracrine mechanisms involving TFG-beta, PGE2, and PAF. The Journal of Clinical Investigation 1998;101:890-898.
14. Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. Journal of hepatology 2001; 34:248-253.
15. Shimamatsu K, Wanless I.R. Role of ischemia in causing apoptosis, atrophy and nodular hyperplasia in human liver. Hepatology 1997;26:343-350.
16. Schulze-Osthoff K., Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter M.E. Apoptosis signaling by death receptors. European Journal of Biochemistry 1998;254:439-459.
17. Mc Partland J, Guzail M, Kendall C, Pringle J. Apoptosis in chronic viral hepatitis parallels histological activity: An immunohistochemical investigation using anti-activated caspase 3 and M30 Cytochrome antibody. International Journal of Experimental Pathology 2005;86:19-24.
18. Kountouras J, Zavos C, and Chatzopoulos D. Apoptosis in Hepatitis C. Journal of Viral Hepatitis 2003;10:335-342.